

# TESIS DOCTORAL



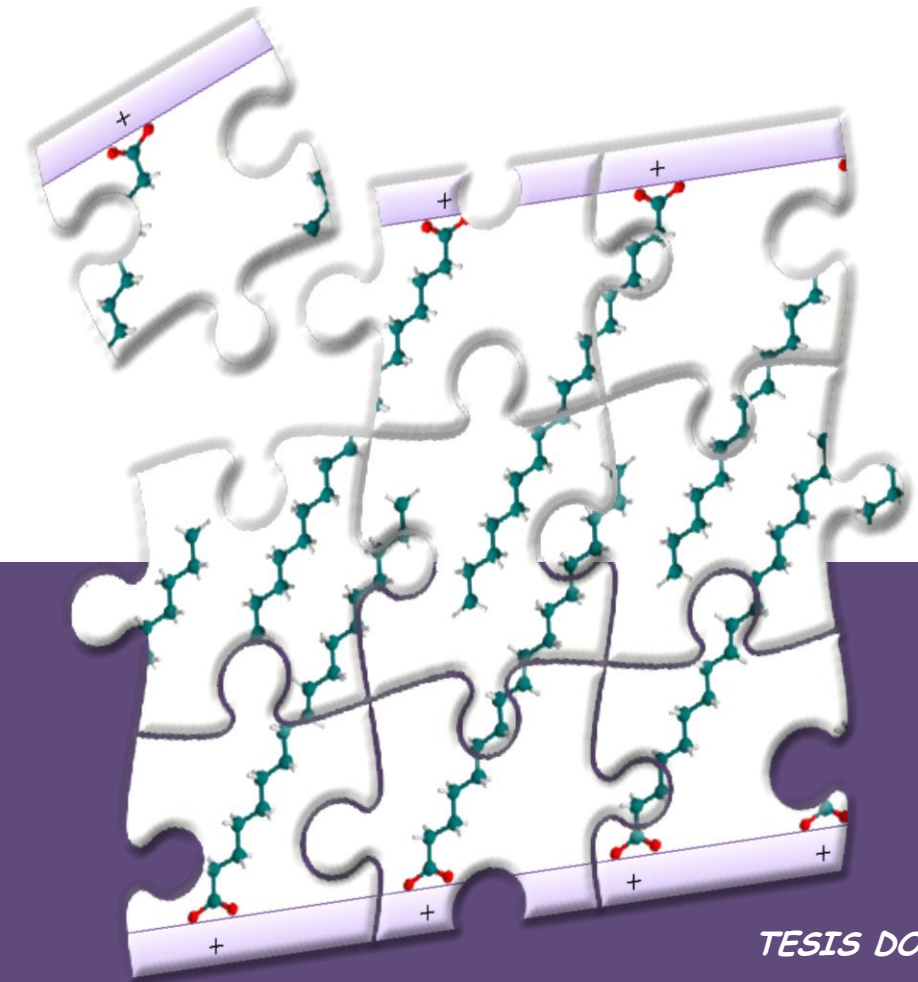
ESTUDIO DE DIVERSOS SISTEMAS ORGANO-ARCILLOSOS COMO ADSORBENTES  
DE PLAGUICIDAS PARA REDUCIR SU IMPACTO AMBIENTAL

M<sup>a</sup> ÁNGELES  
ADELINO SERRA

2014



ESTUDIO DE DIVERSOS SISTEMAS  
ORGANO-ARCILLOSOS COMO  
ADSORBENTES DE PLAGUICIDAS PARA  
REDUCIR SU IMPACTO AMBIENTAL



TESIS DOCTORAL  
M<sup>a</sup> ÁNGELES ADELINO SERRA  
SEVILLA, 2014







# **Estudio de diversos sistemas organo-arcillosos como adsorbentes de plaguicidas para reducir su impacto ambiental**

Memoria que presenta

**M<sup>a</sup> Ángeles Adelino Serra**

para optar al título de Doctor con Mención  
Internacional por la Universidad de Sevilla

Sevilla, Abril de 2014





# **Estudio de diversos sistemas organo-arcillosos como adsorbentes de plaguicidas para reducir su impacto ambiental**

Visado en Sevilla, a 7 de Abril de 2014

## **LOS DIRECTORES**



Dr. Rafael Celis García  
Investigador Científico del CSIC



Dra. Mª Carmen Hermosín Gaviño  
Profesora de Investigación del C.S.I.C.

## **EL TUTOR**



Dra. María Elena Fernández Boy  
Profesora Titular de la Universidad de Sevilla



PROFESOR DOCTOR D. JOSÉ MANUEL PARDO PRIETO, DIRECTOR DEL  
INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada "Estudio de diversos sistemas organo-arcillosos como adsorbentes de plaguicidas para reducir su impacto ambiental", presentada por Dña. Ma Ángeles Adelino Serra para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica y Conservación de Suelos en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (I.R.N.A.S.), bajo la dirección de los Drs. D. Rafael Celis García y Dña. Ma Carmen Hermosín Gaviño, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.



En Sevilla, a 7 de Abril de 2014



El presente trabajo se ha realizado en el marco de los Proyectos AGL2008-04031-C02-01 y AGL2011-23779 del Ministerio de Economía y Competitividad, durante el disfrute de una beca FPI (BES-2009-025196) asociada al primero de los proyectos.



## AGRADECIMIENTOS

---

Me gustaría agradecer a todas las personas que me han ayudado y apoyado para la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de Tesis, la Profesora de Investigación la Dra. Dña. María del Carmen Hermosín Gaviño y el Investigador Científico el Dr. D. Rafael Celis García, por su constancia y dedicación en estos años, por su ayuda, sus consejos y la confianza depositada en mí.

A la Profesora Titular de la Universidad de Sevilla, la Profesora Dra. María Elena Fernández Boy por aceptar la tutela de esta Memoria.

A la Dirección del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por las facilidades prestadas para llevar a cabo este trabajo.

Al Profesor de Investigación Dr. D. Juan Cornejo Suero por sus sugerencias y consejos durante estos años.

A la Investigadora Científica Dra. Dña. Lucía Gracia Cox Meana por facilitarnos el alperujo que fue imprescindible para la realización de esta Tesis Doctoral, por su sinceridad y ayuda desinteresada en estos cuatro años.

Al Prof. D. William C. Koskinen de la Universidad de Minnesota, donde realicé una estancia breve en el año 2012, gracias por su bienvenida, hospitalidad y dedicación al trabajo que allí realicé y que corresponde al apartado de biodisponibilidad de esta memoria.

A la Dra. Dña. Heike Knicker por la ayuda en los análisis de RMN y por sus consejos en la interpretación de los datos. A los Drs. Eduardo Leidi y Engracia Madejón por facilitarnos las medidas de espectroscopia UV-VIS y fluorescencia.

Al Servicio de Análisis del Instituto de Recursos Naturales, por los análisis realizados.

Al Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS), por los análisis de difracción de RX, potencial Z y microscopía electrónica.

Al Centro Tecnológico Innovarcilla por proporcionarnos la arcilla de Bailén utilizada en el capítulo V de este trabajo, así como sus datos de composición.



A mis compañeras de laboratorio en el IRNAS, algunas siguen ya caminos diferentes y otras nuevas llegan. Muchas gracias Bea, Rocío, Gracia, Paqui, Isabel Cardo, Carmen, por las risas y los ánimos en estos cuatro años, sobre todo al final, cuando más lo necesitaba.

También a los niños Miguel, Felipe, Nacho y Leo, por los consejos y los buenos momentos dentro y fuera del trabajo.

No me olvido de los laboratorios del fondo, y los compañeros como Anabel (la pipiolilla), Pili, Chari, Isabel Serrano, Alegría, María Jesús y Manuel, por las risas y por los agradables momentos (Kit Kat). Y sobre todo a vosotras niñas por la ayuda y el apoyo que me ha motivado a para poder llegar a terminar.

A mis niñas, Lisa (la italiana), Carmen (mi rubia favorita) y M. Mar (la Pipi), muchas gracias por todo, por haber estado ahí en los buenos y malos momentos, y sobre todo por aguantarme en los últimos momentos. Y naturalmente a Marco (el italiano), Mil gracias !!!!

Como voy a olvidarme de mi Sevillana favorita, la excepción que confirma la regla y mi hermanita, Isa. Guapa, gracias por tus consejos, tu sinceridad y tu amistad, siempre estaré ahí para lo que necesites.

Gracias Rafa, muchas gracias peque, por estar conmigo, por escuchar, por aconsejar, y animarme tanto en los buenos y malos momentos. Lo hemos conseguido.

A mi familia por todos los sacrificios y por la paciencia que han tenido conmigo, por su apoyo ilimitado para que pudiera llegar hasta donde he llegado. Sois todo para mí, os quiero muchísimo y este trabajo os lo dedico a vosotros.

## **ÍNDICE**

<b>Capítulo I. Introducción general</b>	<b>1</b>
<b>I.1. Plaguicidas: Problemática ambiental</b>	<b>3</b>
<b>I.2. Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en los suelos</b>	<b>5</b>
<b>I.2.1 Procesos de transferencia o transporte</b>	<b>6</b>
<b>I.2.1.1. Adsorción-desorción</b>	<b>6</b>
<b>I.2.1.1.1. Medidas de la adsorción: equilibrio e isothermas</b>	<b>8</b>
<b>I.2.1.2. Infiltración</b>	<b>10</b>
<b>I.2.1.3. Lixiviación</b>	<b>11</b>
<b>I.2.1.3.1. Factores que afectan a la lixiviación</b>	<b>11</b>
<b>I.2.1.4. Otros procesos de transporte</b>	<b>13</b>
<b>I.2.1.4.1. Escorrentía</b>	<b>13</b>
<b>I.2.1.4.2. Volatilización</b>	<b>13</b>
<b>I.2.1.4.3. Difusión</b>	<b>14</b>
<b>I.2.1.4.4. Absorción</b>	<b>14</b>
<b>I.2.2. Procesos de transformación</b>	<b>15</b>
<b>I.2.2.1. Degradación química</b>	<b>15</b>
<b>I.2.2.2. Biodegradación</b>	<b>15</b>
<b>I.2.2.3. Fotodegradación</b>	<b>17</b>
<b>I.3. Fracción coloidal del suelo: Componentes, propiedades adsorbentes de plaguicidas y sus aplicaciones.</b>	<b>17</b>
<b>I.3.1. Arcillas o filosilicatos y organoarcillas</b>	<b>19</b>
<b>I.3.1.1. Filosilicatos</b>	<b>19</b>
<b>I.3.1.2. Organoarcillas</b>	<b>23</b>
<b>I.3.2. Hidrotalcita y organohidrotalcitas</b>	<b>25</b>
<b>Capítulo II. Objetivos.</b>	<b>31</b>
<b>Capítulo III. Estudio del sistema montmorillonita-quitosano</b>	<b>35</b>
<b>III.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>37</b>
<b>III.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>III.2.1. MATERIALES</b>	<b>41</b>
<b>III.2.1.1. Montmorillonita y quitosano</b>	<b>41</b>
<b>III.2.1.2. Plaguicidas</b>	<b>41</b>
<b>III.2.1.3. Suelos</b>	<b>44</b>
<b>III.2.2. MÉTODOS</b>	<b>45</b>
<b>III.2.2.1. Síntesis de los complejos montmorillonita-quitosano (SW-CH)</b>	<b>45</b>
<b>III.2.2.2. Caracterización de los complejos SW-CH</b>	<b>47</b>
<b>III.2.2.3. Evaluación preliminar de los complejos SW-CH como adsorbentes de plaguicidas</b>	<b>48</b>
<b>III.2.2.4. Estudio del herbicida clopiralida como modelo de herbicida aniónico</b>	<b>51</b>
<b>III.2.2.4.1. Estudios de adsorción-desorción en medio acuoso</b>	<b>51</b>
<b>III.2.2.4.2. Estudios de adsorción en suspensión</b>	<b>53</b>

suelo:agua	
<b>III.2.2.4.3.</b> Evaluación de los complejos SW-CH como soportes para la preparación de formulaciones de liberación lenta del herbicida	53
<b>III.2.2.4.3.1.</b> Preparación de las formulaciones	54
<b>III.2.2.4.3.2.</b> Contenido en herbicida de las formulaciones	54
<b>III.2.2.4.3.3.</b> Experimentos de lixiviación	54
<b>III.2.2.4.3.4.</b> Bioensayos	56
<b>III.3.</b> RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
<b>III.3.1.</b> Caracterización de los sistemas montmorillonita-quitosano	58
<b>III.3.1.1.</b> Análisis elemental	58
<b>III.3.1.2.</b> Difracción de rayos X	60
<b>III.3.1.3.</b> Microscopía electrónica de barrido	62
<b>III.3.1.4.</b> Espectroscopia de infrarrojos	64
<b>III.3.1.5.</b> Medidas de potencial Z	66
<b>III.3.2.</b> Evaluación preliminar de los complejos SW-CH como adsorbentes de plaguicidas	68
<b>III.3.3.</b> Aplicaciones relacionadas con la adsorción de plaguicidas aniónicos: la clopiralida	71
<b>III.3.3.1.</b> Estudios de adsorción en medio acuoso	72
<b>III.3.3.1.1.</b> Efecto del pH en la adsorción	72
<b>III.3.3.1.2.</b> Cinética de la adsorción	73
<b>III.3.3.1.3.</b> Adsorción-desorción a los diferentes complejos SW-CH	74
<b>III.3.3.2.</b> Estudios de adsorción en suelos enmendados	77
<b>III.3.3.3.</b> Evaluación de los complejos como soportes para la liberación lenta del herbicida	79
<b>III.3.3.3.1.</b> Características de las formulaciones	79
<b>III.3.3.3.2.</b> Estudios de lixiviación	80
<b>III.3.3.3.3.</b> Bioensayos	82
<b>III.4.</b> CONSIDERACIONES FINALES	85
<b>Capítulo IV. Estudio del sistema hidrotalcita-ácidos grasos insaturados</b>	87
<b>IV.1.</b> INTRODUCCIÓN	89
<b>IV.2.</b> MATERIALES Y MÉTODOS	95
<b>IV.2.1.</b> MATERIALES	95
<b>IV.2.1.1.</b> Hidrotalcita de partida	95
<b>IV.2.1.2.</b> Aniones orgánicos utilizados para la obtención de las organohidrotalcitas	95
<b>IV.2.1.3.</b> Plaguicidas	98
<b>IV.2.1.4.</b> Suelos	98
<b>IV.2.2.</b> MÉTODOS	99
<b>IV.2.2.1.</b> Síntesis de la hidrotalcita de partida y de su producto de calcinación	99

<b>IV.2.2.2.</b> Síntesis de las organohidrotalcitas	100
<b>IV.2.2.3.</b> Caracterización de las organohidrotalcitas	101
<b>IV.2.2.4.</b> Evaluación preliminar de las organohidrotalcitas como adsorbentes de plaguicidas	103
<b>IV.2.2.5.</b> Biodisponibilidad	104
<b>IV.2.2.6.</b> Evaluación adicional de posibles aplicaciones de los adsorbentes para el fungicida metalaxil	105
<b>IV.2.2.6.1.</b> Estudios de adsorción-desorción a los adsorbentes	105
<b>IV.2.2.6.2.</b> Estudios de adsorción en suspensiones suelo:agua	106
<b>IV.2.2.6.3.</b> Evaluación de las organohidrotalcitas como soportes para la preparación de formulaciones de liberación lenta de metalaxil	107
<b>IV.2.2.6.3.1.</b> Preparación de las formulaciones	107
<b>IV.2.2.6.3.2.</b> Contenido de fungicida en las formulaciones	107
<b>IV.2.2.6.3.3.</b> Experimentos de lixiviación	108
<b>IV.3.</b> RESULTADOS Y DISCUSIÓN	112
<b>IV.3.1.</b> Caracterización de las muestras	112
<b>IV.3.1.1.</b> Análisis elemental	112
<b>IV.3.1.2.</b> Difracción de rayos X	115
<b>IV.3.1.3.</b> Microscopía electrónica de barrido y de transmisión	122
<b>IV.3.1.4.</b> Espectroscopia de infrarrojos	124
<b>IV.3.1.5.</b> Medidas de potencial Z	128
<b>IV.3.1.6.</b> Estabilidad de las organohidrotalcitas	131
<b>IV.3.2.</b> Evaluación preliminar de las organohidrotalcitas como adsorbentes de plaguicidas y su efecto en la biodisponibilidad	132
<b>IV.3.2.1.</b> Estudios de adsorción	132
<b>IV.3.2.2.</b> Estudio de biodisponibilidad	138
<b>IV.3.3.</b> Aplicaciones relacionadas con la adsorción del fungicida metalaxil	140
<b>IV.3.3.1.</b> Estudios de adsorción-desorción en medio acuoso	140
<b>IV.3.3.1.1.</b> Efecto del pH en la estabilidad del metalaxil en disolución	140
<b>IV.3.3.1.2.</b> Cinética de adsorción	142
<b>IV.3.3.1.3.</b> Isotermas de adsorción y estudio de la desorción	142
<b>IV.3.3.2.</b> Estudios de adsorción en suelos enmendados	145
<b>IV.3.3.3.</b> Evaluación de las organohidrotalcitas como soportes para la liberación lenta del fungicida	146
<b>IV.3.3.3.1.</b> Características de las formulaciones	146

<b>IV.3.3.3.2.</b> Estudio de la liberación en agua del fungicida	147
<b>IV.3.3.3.3.</b> Estudio de lixiviación	148
<b>IV.4.</b> CONSIDERACIONES FINALES	157
<b>Capítulo V. Sistemas arcillas-MOS</b>	159
<b>V.1.</b> INTRODUCCIÓN	161
<b>V.2.</b> MATERIALES Y MÉTODOS	166
<b>V.2.1.</b> MATERIALES	166
<b>V.2.1.1.</b> Arcillas	166
<b>V.2.1.2.</b> Alperujo: Extracción de la MOS	166
<b>V.2.1.3.</b> Contaminantes orgánicos: herbicidas y dibenzofurano	167
<b>V.2.1.4.</b> Suelo	169
<b>V.2.2.</b> METODOS	170
<b>V.2.2.1.</b> Caracterización de las arcillas y el alperujo	170
<b>V.2.2.2.</b> Estudio de las arcillas como adsorbentes de la MOS procedente de alperujo	171
<b>V.2.2.2.1.</b> Caracterización de los sobrenadantes	172
<b>V.2.2.2.2.</b> Caracterización de los complejos arcilla-MOS	174
<b>V.2.2.3.</b> Evaluación de los complejos arcilla-MOS como adsorbentes de plaguicidas	175
<b>V.2.2.4.</b> Evaluación de los complejos arcilla-MOS con respecto a las arcillas originales como adsorbentes de plaguicidas en presencia de suelo	176
<b>V.3.</b> RESULTADOS Y DISCUSIÓN	178
<b>V.3.1.</b> Caracterización de los adsorbentes y el alperujo	178
<b>V.3.1.1.</b> Caracterización de las arcillas	178
<b>V.3.1.2.</b> Caracterización del alperujo	182
<b>V.3.2.</b> Evaluación de las arcillas como adsorbentes de la MOS del alperujo	174
<b>V.3.2.1.</b> Caracterización de los sobrenadantes	174
<b>V.3.2.2.</b> Caracterización de los complejos arcilla-MOS	193
<b>V.3.3.</b> Evaluación de los complejos arcilla-MOS como adsorbentes de plaguicidas	202
<b>V.3.4.</b> Evaluación de los complejos formados in situ en presencia de suelo como adsorbentes de plaguicidas	207
<b>V.4.</b> CONSIDERACIONES FINALES	211
<b>Capítulo VI. Conclusiones Generales / General Conclusions</b>	213
<b>Capítulo VII. Bibliografía</b>	223
<b>Capítulo VIII. Publicaciones</b>	261

La sostenibilidad de la actividad agraria obliga en la actualidad a diseñar y desarrollar posibles estrategias que minimicen sus impactos negativos en el medioambiente a la vez que permitan mejorar la cantidad y calidad de la producción agroalimentaria. Uno de los efectos adversos, que puede llegar a tener una gran repercusión social por afectar a la salud, es la contaminación de suelos, aguas superficiales y aguas subterráneas, provocada por los plaguicidas aplicados a los suelos agrícolas. En Andalucía, nos encontramos en una zona de clima Mediterráneo con suelos con bajo contenido de materia orgánica y que, por tanto, presentan una baja capacidad de adsorción para plaguicidas. En algunas zonas de gran importancia agrícola como la olivarera muchos de estos suelos se encuentran además en pendiente. Todo ello, junto con episodios habituales de breves pero intensas lluvias, acentúa los procesos de transporte por lixiviación y escorrentía de los plaguicidas aplicados y dan como resultado una disminución de la eficacia de los mismos y un aumento del riesgo de contaminación de suelos y aguas superficiales y subterráneas adyacentes. El objetivo general de este trabajo es conseguir disminuir los procesos de transporte de los plaguicidas y sus efectos adversos, aumentando la capacidad de adsorción o retención en los suelos y conseguir con ello aumentar el tiempo de permanencia del producto fitosanitario en la zona radicular donde normalmente ha de ejercer su acción.

En esta memoria se han preparado, caracterizado y evaluado como adsorbentes diversos sistemas basados en materiales naturales. Los llamamos bio o eco-inspirados por ser sintetizados a partir de arcillas que se encuentran formando parte de los suelos (montmorillonita e hidrotalcita) modificadas con iones orgánicos que también existen en la naturaleza (para dar organoarcillas u organohidrotalcitas). La finalidad ha sido comprobar su utilidad como: 1) adsorbentes para eliminar los plaguicidas de aguas, 2) enmendantes en distintos suelos para incrementar su capacidad de retención para diferentes plaguicidas y de esta manera poder reducir los efectos adversos provocados por una rápida lixiviación y escorrentía de los mismos y 3) portadores en posibles formulaciones de liberación controlada, con el mismo efecto beneficioso.

Se utilizaron tres tipos de modificadores orgánicos bien diferenciados: a) el quitosano (Capítulo III) sólo con arcillas catiónicas, b) distintos ácidos grasos insaturados con el mismo número de carbonos (Capítulo IV) con arcillas aniónicas y c) la materia orgánica soluble procedente de un residuo agroalimentario (alperujo), en este caso con ambos tipos de arcillas (Capítulo V). Los plaguicidas ensayados se eligieron en función de sus diferentes características fisicoquímicas (hidrofobicidad, polaridad y carácter ácido-base o neutro), y por tratarse de moléculas de referencia (atrazina) o relevantes por su uso en cultivos andaluces (clopiralida, imazamox, etc.). Además, en el Capítulo V se contempló un contaminante orgánico de origen industrial altamente hidrófobo. En el Capítulo IV también se aborda el efecto de las formulaciones sobre el comportamiento enantiomérico del fungicida metalaxil.

Resumiendo, los resultados obtenidos e interpretados en esta Tesis permiten afirmar que compuestos orgánicos naturales como el quitosano, los ácidos grasos o la materia orgánica soluble procedente de un residuo agroalimentario (alperujo) pueden usarse para obtener complejos con arcillas catiónicas y aniónicas que pueden ser buenos adsorbentes de plaguicidas u otros contaminantes orgánicos y que pueden ser empleados, dependiendo de su nivel o capacidad de adsorción, para eliminar estos compuestos de las aguas o para disminuir su movilidad en el suelo, bien como enmendantes o posibles barreras en suelos, bien actuando de portadores en formulaciones de liberación controlada. También se demuestra la posible utilidad de las arcillas para disminuir la toxicidad asociada a la materia orgánica soluble del alperujo y la corrección de la acumulación del enantiómero no activo de metalaxil en el suelo. Se vuelve a comprobar que el alcance o rango de estas aplicaciones depende tanto del tipo de adsorbente y de las características del plaguicida o contaminante, como del tipo del suelo del que se trate, siendo muy difícil, al menos por ahora, hacer un diseño o estrategia genérica.

The sustainability of farming activity nowadays requires the design and development of strategies to minimize its potential negative impacts on the environment and, at the same time, to improve the quantity and quality of food production. Because of the impact on public opinion and health concern, one of the most adverse and concerning side-effects from agriculture is the contamination of soil, surface water and ground water, due to pesticides applied to agricultural soils. In Andalusia, we are in an area of Mediterranean climate with soils being poor in organic matter and therefore with low adsorption capacity for pesticides. In addition, many farming areas are developed in medium-high slope lands such as those devoted to olive grove. Both peculiarities along with brief episodes of intense rainfall in late fall, winter, and early spring, enhance the transport losses by leaching and runoff of the applied agrochemicals. Such losses result in a decrease in pesticide efficacy and an increase in the risk of soil and surface and ground water contamination. The main goal of this research is to reduce the transport processes of pesticides and their adverse effects, for instance by increasing the adsorption capacity of the soils to achieve increased residence time of the product in the root zone where it normally has to act.

Various materials based on natural compounds have been prepared, characterized, and comparatively evaluated as adsorbents in this report. We called them "bio-" or "eco-inspired" organo-clay adsorbents for being synthesized from clays that are natural soil constituents (montmorillonite and hydrotalcite) modified with various organic ions that also exist in nature or soluble organic matter (SOM) extracted from a (natural) agricultural residue (alperujo or olive oil mill waste). Once prepared, these biomaterials were thoroughly characterized and tested as: 1) adsorbents to remove pesticides from water, 2) soil-amendments to increase the adsorption capacity of soils for different pesticides and thus, to reduce rapid leaching out to ground water, and 3) pesticide carriers for the development of sustained release formulations, with similar beneficial effects.

Three distinct types of organic ions were used as clay modifiers: a) chitosan (Chapter III) as a modifier of cationic clays, b) unsaturated fatty acid anions (Chapter IV) as modifiers of anionic clays and c) the soluble organic matter from an agro-food residue (alperujo), in this case with both types of clays (Chapter V). The tested pesticides were chosen according to their different physicochemical characteristics (hydrophobicity, polarity, and acid-base or neutral character) and for being reference molecules (atrazine) or relevant for their use in Andalusian cultures (clopyralid, imazamox, etc.). In addition, a highly hydrophobic organic pollutant of industrial origin was also considered in Chapter V. In Chapter IV the effect of the formulations on the enantiomeric behavior of the fungicide metalaxyl was also addressed.

The results obtained and interpreted in this Thesis support the conclusion that natural organic compounds such as chitosan, fatty acids or the



soluble organic matter from an agro-food waste (alperujo) allow the preparation of complexes with cationic and anionic clays, which generally perform as better adsorbents of pesticides and other organic pollutants than the corresponding starting raw clay material. Most of them are shown to be useful, depending on their level of adsorption capacity, to remove these compounds from water and/or to reduce their mobility in the soil to avoid ground water pollution. This latter effect may be reached either by their use as soil amendment or barrier or by acting as carriers in controlled/slow release formulations. The potential usefulness of clays in reducing the toxicity of alperujo, generally associated with its soluble organic matter content, and in correcting the accumulation of the inactive enantiomer of metalaxyl in the soil is also demonstrated. The scope or range of these applications depends on the type of adsorbent, the characteristics of the pesticide or contaminant, and the soil type in which they would be used or applied, and hence, it is very difficult, at least for now, to draw a generic design or strategy.



## I. Introducción General



### I.1. Plaguicidas: Problemática ambiental

La agricultura actual en los países desarrollados ha alcanzado elevadas tasas de producción de alimento y productos agroindustriales gracias al desarrollo tecnológico basado en el avance continuado del conocimiento del suelo, planta, maquinaria, fertilizantes y plaguicidas fundamentalmente. Sin duda desde el descubrimiento de que el DDT podía controlar las plagas de la agricultura hasta el empleo de semillas resistentes a algunos herbicidas hay todo un recorrido de casi un siglo. Durante este tiempo, el empleo de plaguicidas ha contribuido al aumento de la producción agrícola de forma global, a pesar de las consecuencias ambientales. Estos compuestos agroquímicos resultan imprescindibles para mantener el nivel de producción y calidad de los alimentos para la sociedad ya que, según la FAO (2012), el cese del empleo de estos productos fitosanitarios en un país desarrollado como EEUU reduciría el rendimiento de las cosechas y del ganado en un 30-40% y aumentaría el precio de los productos agrícolas en un 50-70% (Green, 1984; Cheng, 1990; Tilman et al., 2002).

Un plaguicida (o pesticida) es "cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga" (FIFRA, 1947). Los plaguicidas son utilizados en diversos sectores económicos, como la agricultura, silvicultura, transporte (carreteras), zonas industriales, parques y en los hogares (jardines) y se corresponden con un amplio espectro de sustancias químicas orgánicas e inorgánicas utilizadas para el control de plagas y enfermedades en las actividades agropecuaria y forestal. Sin embargo, entre estos sectores la agricultura es, con diferencia, el principal usuario, con aproximadamente el 90% del total de plaguicidas vendidos (Brouwer et al., 1994).

A principios de la década de los sesenta Carlson (1962) señalaba la amplia distribución ambiental de los plaguicidas (en suelo, aire, agua, biota, etc.), así como sus efectos no sólo en la salud humana, sino en todo el sistema vital del planeta, asociados al uso indiscriminado de los mismos (Fig. I.1). De hecho, este libro fue el detonante para el arranque de una línea de investigación, iniciada entonces en USA e impulsada por JF Kennedy, para profundizar en el conocimiento de los efectos secundarios adversos de los pesticidas, que llega hasta nuestros días y que ha permitido el desarrollo de estrategias que minimicen estos impactos no deseados.



Fig. I.1. Aplicación de plaguicidas en campos de arroz

Los pesticidas se aplican según su sistema de acción (sistémico, de contacto, curativo o preventivo) sobre el cultivo a tratar e incluso en el suelo que lo soporta. No obstante, todos los pesticidas, en mayor o menor medida, van a parar al suelo y es más, frecuentemente sólo entre un 1 y un 20% del producto aplicado alcanza la plaga diana contra la que se pretende actuar; una gran parte del compuesto se dispersa en el ambiente, lo que obliga a un aumento en las dosis de aplicación para obtener el objetivo deseado en las cosechas. Sin duda, este incremento, junto con la aplicación repetida de plaguicidas a lo largo de los años, puede llegar a convertirse en fuente de contaminación puntual y/o difusa de suelos y aguas superficiales y subterráneas, no sólo por los compuestos aplicados sino también por los residuos de éstos.

El suelo es un sistema complejo, dinámico y vivo, con compartimentos o fases distintas (sólida, líquida y gaseosa), en el cual coexisten componentes relativamente inertes o minerales con otros componentes orgánicos con plazos más cortos de cambio o evolución, así como organismos vivos vegetales, animales y microorganismos, todos ellos en continua interacción. El suelo en su conjunto presenta la capacidad, dentro de una medida, de autodepuración frente a sustancias xenobióticas como son los plaguicidas, contrarrestando o amortiguando el impacto producido por su aplicación (Cornejo et al., 2005). Sin embargo, en los últimos años el aporte continuado y diverso de éstos al suelo ha superado la propia capacidad del mismo de amortiguar su efecto, pasando los agroquímicos a ocupar espacios del ecosistema para los que no estaban destinados (aguas superficiales, subterráneas, etc.). Este creciente conflicto ha despertado la necesidad de continuar los estudios del comportamiento de estos compuestos en el suelo, para, desde su manejo, poder hacer un uso sostenible de los mismos, que tiene aún muchos aspectos, retos y oportunidades por abordar (Fenner et al., 2013; Enserink et al., 2013)

### I.2. Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en los suelos

La forma en que llegan los plaguicidas al suelo varía dependiendo de la forma de aplicación de los mismos. La aplicación directa del plaguicida sobre el suelo es la más inmediata, ya que se aplica directamente sobre la superficie o, en algunos casos, por inyecciones superficiales localizadas. También pueden llegar al suelo desde las partes aéreas de las plantas moviéndose debido a las lluvias o vientos, o también a partir de los restos vegetales de dichas plantas que se incorporan al suelo tras la cosecha.

Una vez que el plaguicida se encuentra en el suelo, se producen varios procesos simultáneos que pueden afectarlo y que marcan de alguna forma su destino final. Dichos procesos podemos clasificarlos en dos grandes grupos: procesos de transferencia o transporte y procesos de transformación o degradación (Tabla I.1).

Tabla I.1. Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo.

PROCESOS	
<i>Transferencia</i>	<i>Transformación</i>
Adsorción-desorción	Degradación química
Infiltración	Biodegradación
Lixiviación	Fotodegradación
Escorrentía	
Volatilización	
Absorción	
Difusión	

Los **procesos de transferencia** son aquellos en los que la naturaleza química del plaguicida no se ve afectada, e implican mecanismos físico-químicos o biológicos que dan lugar al movimiento o transferencia de las moléculas del plaguicida de una fase a otra o dentro de una misma de las fases sólida/líquida/gaseosa del suelo o entre sistemas distintos como suelo, agua, atmósfera o ser vivo. Entre los mecanismos de transferencia pueden destacarse: la adsorción-desorción, la infiltración, la lixiviación, la escorrentía, la volatilización, la absorción y la difusión (Fig. I.2).

Por el contrario, aquellos procesos que implican cambios en la estructura de la molécula del plaguicida son denominados **procesos de transformación** (degradación química, biodegradación y fotodegradación). En los procesos de transformación, el plaguicida se modifica o degrada en otros compuestos que pueden ser de igual, mayor o menor toxicidad (Fig. I.2).

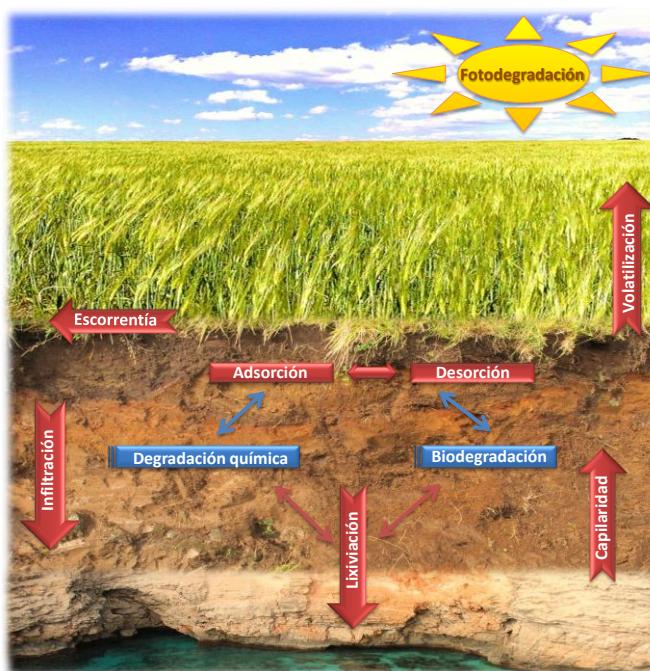


Fig.I.2. Procesos determinantes de la dinámica de los plaguicidas en el suelo

### I.2.1. Procesos de transferencia o transporte

Son aquellos procesos por los que el plaguicida se desplaza de una fase a otra del suelo o, dentro de una misma fase, cambia de sistema o lugar sin experimentar cambio en su estructura y, por tanto, manteniendo su actividad biológica y potencial contaminante.

#### I.2.1.1. Adsorción-desorción

El proceso de adsorción es fundamental en el comportamiento de los plaguicidas en el suelo, ya que afecta al resto de procesos que determinan tanto el pesticida que hay en la solución del suelo como el asociado a partículas finas y que, por tanto, está disponible para ser transportado, degradado, absorbido por plantas y microorganismos, etc. La adsorción es un proceso dinámico por el cual las moléculas de un compuesto llamado adsorbato que se encuentran en una fase fluida (líquida o gaseosa), se adhieren por distintos tipos de fuerzas o mecanismos de interacción a la superficie de un sólido, llamado adsorbente, donde quedan retenidos. Generalmente, en el suelo es habitual que el proceso de adsorción se produzca predominantemente en fase acuosa, aunque también se puede dar en la gaseosa. A este medio global donde se produce la adsorción

se le suele denominar como disolución, siendo el disolvente generalmente agua. La adsorción está controlada, por un lado, por la interacción del soluto con la fase fluida o solvente y, por otro, por sus interacciones con la fase sólida. Existen varias fuerzas atractivas entre las moléculas de soluto y la superficie sólida o adsorbente, las del soluto o adsorbato entre sí y las del solvente con la superficie adsorbente. Por tanto, al ser la adsorción un fenómeno que ocurre en las superficies sólidas, en este caso del suelo, dependerá de la composición y textura de los sólidos que compongan el suelo. Los primeros trabajos que contemplaban o revisaban la adsorción de los pesticidas en suelos resaltaban la importancia de la fracción coloidal o arcilla ( $<2\ \mu\text{m}$ ), ya que por su pequeño tamaño de partícula lleva asociada una gran cantidad de superficie y, además, está compuesta por minerales de la arcilla y óxidos junto con materia orgánica, todos ellos con una gran cantidad de grupos superficiales o funcionales muy activos en los procesos de adsorción (Bailey y White 1970; Weber et al., 1973; Senesi y Cheng, 1986; Cheng, 1990; Cornejo y Hermosín, 1996). De hecho, son los minerales de la arcilla y la materia orgánica de los suelos los componentes que determinan la adsorción de pesticidas y otros compuestos orgánicos en los mismos, de forma que se han llegado a definir unos parámetros referidos a su proporción en el suelo (Karickhoff, 1981; Hermosín et al., 2000).

En la adsorción de plaguicidas por los componentes del suelo, al tratarse fundamentalmente de compuestos orgánicos, se podrán encontrar interacciones de tipo **fuerzas de Van der Waals**, caso de la adsorción del picloram o el imazetapir sobre ácidos húmicos (Nearpass, 1976; Senesi et al., 1997); interacciones de tipo **iónico**, que se dan en plaguicidas catiónicos o protonables como diquat y paraquat, clodimeform (Weed y Weber, 1969; Hermosín y Pérez-Rodríguez, 1981) y de la familia de las triazinas (Roy et al., 2000; Herwig et al., 2001); **interacciones hidrofóbicas**, que son un mecanismo importante de adsorción en plaguicidas de tipo neutro, como el caso del triadimefón (Celis et al., 2000), norfluorazona (Nir et al., 2000) o hexazinona (Celis et al., 2002a); interacciones de tipo **enlace de hidrógeno**, que se suelen dar en moléculas con grupos funcionales con nitrógeno u oxígeno, elementos altamente electronegativos que tienden a formar este tipo de enlace, como en el caso de tiazafurón (Cox et al., 1995) e imazaquín (Ferreira et al., 2002). También se han descrito: a) **enlaces covalentes**, entre grupos polares distintos del plaguicida y de la materia orgánica o los minerales de la arcilla u óxidos (Bollag y Myers, 1992; Senesi, 1992); b) **transferencia de carga** como en la atrazina con los ácidos húmicos (Senesi, 1992) y c) **cambio de ligando**, observados en herbicidas de tipo s-triazinas y plaguicidas aniónicos (Nearpass, 1976; Senesi, 1992).

Otro tipo de adsorción en el suelo que puede o no tener una pequeña contribución en este tipo de enlace es una adsorción física o fisisorción, de carácter en general más débil, pero que puede llegar a ser tan fuerte como una adsorción química. Es la que ocurre por simple difusión de las moléculas de plaguicidas hacia el interior de los meso, micro y nanoporos de los componentes



del suelo en condiciones de suficiente humedad y que una vez en el interior de los mismos no salen fácilmente. Este tipo de interacción ha sido descrita por Pignatello y Xing (1996) y puede llegar a dar lugar a residuos recalcitrantes o enlazados, sin que medie ningún tipo de interacción específica con la superficie en la que se encuentran.

La **desorción** es el proceso inverso a la adsorción, en el que el adsorbato es transferido desde su estado adsorbido en la superficie del sólido al disolvente. Cuando la desorción sigue o reproduce el mismo equilibrio que la adsorción, se dice que el proceso de adsorción es reversible, pero lo habitual es encontrar desorción parcial del adsorbato o incluso nula, cuando parte o todo el adsorbato está irreversiblemente adsorbido (Celis y Koskinen, 1999). Mientras que la adsorción de compuestos orgánicos por el suelo y sus constituyentes ha sido ampliamente documentada, la desorción se encuentra menos estudiada. Sin embargo, la liberación (desorción) de los contaminantes adsorbidos presenta una importancia primordial para conocer la distribución del compuesto en el medio ambiente, llegando a ser especialmente importante para predecir su comportamiento y movilidad en compartimentos ambientales contaminados y desarrollar estrategias de remediación adecuadas (Scheidegger y Sparks, 1996).

Este proceso de adsorción-desorción será tratado más adelante enfocado sobre los componentes coloidales del suelo, cuya relevancia ha conducido al diseño y desarrollo de adsorbentes modelos específicos para tratar de manejar su papel en el suelo.

### **I.2.1.1.1. Medidas de la adsorción: equilibrio e isothermas**

a) *Concepto del equilibrio en la adsorción*: Los procesos de adsorción y desorción de moléculas sobre la superficie de un adsorbente son dinámicos y relacionados, dándose de forma continuada a lo largo del tiempo. Las moléculas orgánicas se adsorben y desorben, alcanzando un equilibrio dinámico de la adsorción. En este equilibrio la concentración de moléculas en la superficie del adsorbente ( $C_s$ ,  $\mu\text{mol}$  o  $\text{mmol/g}$ ) alcanza un equilibrio con la concentración en la disolución ( $C_e$ ,  $\mu\text{mol}$  o  $\text{mmol/l}$ ) en contacto con dicho sólido. Podemos expresar el equilibrio de adsorción de un compuesto orgánico como:

$$C_e \rightleftharpoons C_s$$

Frecuentemente se supone que  $C_s$  depende linealmente de  $C_e$  y se define un coeficiente de distribución,  $K_d$ , como:

$$K_d = C_s / C_e$$

En la ecuación anterior se muestra una relación directamente proporcional entre la concentración de adsorbato en el disolvente o fase líquida y la concentración en el sólido o fase sólida. Esta forma lineal generalmente describe correctamente el equilibrio a bajas concentraciones de adsorbato en la fase líquida. Sin embargo, son habituales los casos en los cuales la relación entre la cantidad adsorbida y la cantidad en disolución no es lineal, por lo que el valor de  $K_d$  depende de la concentración a la que se trabaje. Las distintas formas más generales que suelen darse se describen a continuación.

b) Tipos de isothermas de adsorción: La caracterización y cuantificación del proceso de adsorción requiere información relativa a la naturaleza y estado del equilibrio termodinámico que conduce a dicho proceso. Como se ha dicho anteriormente, este equilibrio se manifiesta como la distribución final del plaguicida entre la fase sólida o estado adsorbido ( $C_s$ ) y la fase acuosa o estado disuelto ( $C_e$ ). La relación que describe el equilibrio, a una determinada temperatura, entre  $C_s$  y  $C_e$  es lo que se conoce con el nombre de isoterma de adsorción.

Giles et al. (1960) propusieron cuatro tipos generales de isothermas de adsorción, dependiendo de su forma, y especialmente de la forma del tramo inicial, a partir de las cuales se obtiene información del mecanismo de adsorción, la naturaleza del adsorbato y de la superficie del adsorbente. En la Fig. I.3 se muestran las cuatro clases de isothermas de adsorción:

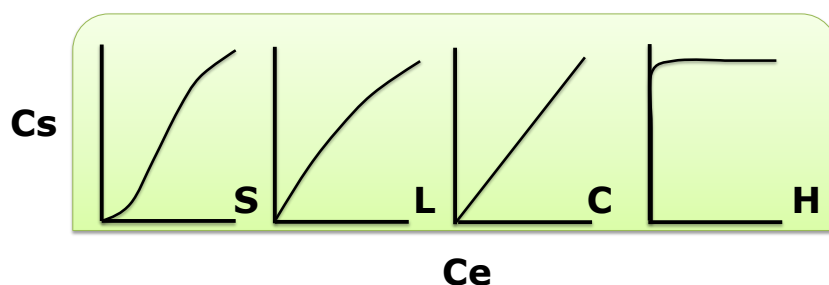


Fig.I.3. Tipos de isothermas de adsorción según Giles et al. (1960)

Isotermas tipo S: Estas isothermas son típicas de adsorbentes con una alta afinidad por el disolvente. La curvatura inicial de la isoterma indica que la adsorción se ve facilitada a medida que aumenta la concentración del soluto. Esto suele reflejar una asociación entre las moléculas adsorbidas y las moléculas aún en solución, constituyendo lo que se denomina "adsorción cooperativa". Estas isothermas suelen observarse cuando ocurre una interacción específica entre el soluto y el adsorbente, una atracción intermolecular moderada o

competencia entre el soluto, el disolvente y las moléculas adsorbidas por los sitios específicos de adsorción.

Isotermas tipo L: Son las más conocidas y muchas veces se les llama isotermas normales o de Langmuir, esta última por seguir su ecuación de adsorción. La forma de este tipo de isotermas indica la dificultad para que las moléculas de adsorbato encuentren sitios de adsorción vacantes a medida que progresa la adsorción. Caracterizan a sistemas en los que el adsorbato presenta una alta afinidad por el adsorbente y en los que se da escasa competencia soluto-disolvente por los sitios de adsorción. Cuando estos sitios se agotan, el adsorbente alcanza su saturación.

Isotermas tipo C: Se caracterizan por presentar una relación lineal entre la cantidad de soluto adsorbido y la concentración del mismo en la disolución de equilibrio. Debido a que es el tipo de curva que se obtiene para el reparto de un soluto entre dos disolventes inmiscibles, algunos autores utilizan el término partición o reparto del soluto entre el adsorbente y la disolución (Chiou et al., 1979; Rutherford et al., 1992).

Isotermas tipo H: Son isotermas poco comunes y representan un caso especial de las isotermas tipo L. Se observan cuando hay una afinidad muy elevada entre el soluto y la superficie adsorbente de forma que a bajas concentraciones de soluto todo o prácticamente todo queda adsorbido en la superficie. La parte inicial de la isoterma es por esta razón vertical. Es poco habitual y suele darse para adsorbatos de elevado peso molecular como micelas iónicas o especies poliméricas.

c) Modelización: Estas isotermas de adsorción obtenidas por representación se modelizan de acuerdo con unas ecuaciones que relacionan  $C_s$  en función de  $C_e$  y para la que se han dado numerosos modelos (Kinniburgh, 1986) que se adaptan o describen más o menos satisfactoriamente los diversos tipos de isotermas. En general, para suelos y coloides del suelo las más empleadas son la ecuación de Freundlich, que se adapta bien a todas las formas excepto a la H, y la ecuación de Langmuir, que se adapta bien a todas excepto a la forma S. En este trabajo, dado que no se encuentran isotermas de tipo H, se ha empleado la isoterma de Freundlich, por su versatilidad a la hora de comparar parámetros cuantificadores de la adsorción y se describirá en el apartado de metodología de los correspondientes capítulos.

### I.2.1.2. Infiltración

Es el movimiento en vertical sobre los primeros centímetros de la capa arable del suelo que experimenta un plaguicida cuando es arrastrado desde la superficie del suelo hacia el interior y es justo el paso previo a la lixiviación.

Generalmente hay pocos trabajos que distingan entre estos dos procesos, salvo los que se realizan en el campo y a gran escala (Arora et al., 2010).

### **I.2.1.3. Lixiviación**

En el momento en el que el suelo se encuentra saturado en agua, y no es capaz de retener más agua, el exceso de agua es transportado junto con el material soluble y algún material particulado a lo largo del perfil por acción de la gravedad. Por este mecanismo, los contaminantes orgánicos, como los plaguicidas, contenidos en los suelos son transportados hasta llegar a zonas más profundas, pudiendo alcanzar las aguas subterráneas. El efecto que se produce por la interacción de los plaguicidas o contaminantes con la materia orgánica soluble y las partículas en suspensión contenidas en el agua de lixiviación incrementa la solubilidad de los mismos, facilitando su transporte a través del perfil del suelo (Casanovas, 1996; Cortinas, 2003).

Las pérdidas de plaguicidas por lixiviación se pueden poner algo más en perspectiva al considerar la normativa de la UE (Directiva 2000/60/EC), que establece que las concentraciones de un pesticida en aguas de abastecimiento público no podrán superar los 0.1 ppb. Para una dosis de 0.2 kg/ha y una recarga anual de 200 mm, se estima que el máximo permitido de lixiviación es del 0.1% de la cantidad aplicada (Jarvis, 2007), lo que supondría un riesgo para la contaminación de acuíferos.

#### **I.2.1.3.1. Factores que afectan a la lixiviación**

La lixiviación de contaminantes a las aguas subterráneas es un proceso influenciado por muchas variables como parámetros atmosféricos (precipitación y temperatura), las propiedades del suelo (tamaño de partícula, contenido de carbono orgánico, etc.), prácticas de manejo del suelo, que determinarán bien el tipo de plaguicida a aplicar o el riego, y las propiedades físico-químicas del producto químico (solubilidad en agua, presión de vapor, etc.). Posteriormente, la biodegradabilidad y la adsorción dependen de las propiedades del soluto y del suelo, siendo decisivos para los compuestos orgánicos, como los plaguicidas, en la predicción de la contaminación de las aguas subterráneas.

La lixiviación de los plaguicidas está estrechamente influenciada por la dinámica del proceso de adsorción al suelo y se halla afectada por características del suelo como el contenido en arcilla, el pH, el contenido en óxidos metálicos y materia orgánica, etc., y no se puede generalizar usando sólo una de estas características (Cecchi et al., 2004)

La adsorción de los plaguicidas a los coloides del suelo determina en gran medida la lixiviación, de manera que al aumentar dicha adsorción,

disminuye la movilidad del plaguicida a través del perfil del suelo. Existen numerosos trabajos cuyos datos experimentales para plaguicidas y otros compuestos orgánicos muestran una relación inversa entre la adsorción y la lixiviación (Kookana et al., 1995; Laabs et al., 2002; Araki et al., 2003; Cornejo et al., 2005). Las propias características del suelo que influyan en la adsorción, como puede ser la textura, materia orgánica, mineralogía, pH, etc. tendrán una incidencia en la lixiviación.

El contenido en materia coloidal orgánica del suelo es un factor a tener en cuenta en la inmovilización del plaguicida. Por los procesos de desorción, los plaguicidas vuelven a estar en disolución y, por tanto, pueden movilizarse por el perfil del suelo por lixiviación (Worral et al., 1999).

La materia orgánica soluble (MOS) puede reducir la adsorción del plaguicida al suelo y aumentar la lixiviación (Celis et al., 1998a; Barriuso et al., 2011):

- Favoreciendo la desorción del plaguicida por procesos de competencia por la asociación de la MOS con el suelo
- Asociándose a las moléculas del plaguicida y facilitando su transporte por el perfil del suelo.

La estructura del suelo, formada por macro y microporos, provoca variaciones en el transporte del plaguicida en el suelo. En los macroporos predominan el transporte hidrodinámico y la difusión, mientras que en los microporos predominan los procesos de difusión, adsorción y degradación (Cox et al., 1997b)

Las propiedades físico-químicas del plaguicida más importantes respecto a la lixiviación son aquellas que determinan el grado de retención del compuesto al suelo, ya que cuanto más fuertemente sea retenido o adsorbido un plaguicida por el suelo, menor será su potencial de lixiviación. Por ejemplo, la solubilidad en agua, el carácter ionizable, la presión de vapor, el peso molecular y la hidrofobicidad serán factores claves para predecir si un plaguicida será más o menos lixiviable.

Puesto que la lixiviación se produce por movimiento gravitacional del agua a través del suelo, el aporte de agua en cuanto a cantidad, intensidad, distribución y frecuencia, determinará el proceso de lixiviación. El riesgo reside en el agua de lluvia, ya que no se puede controlar. Sin embargo, la influencia estacional de las lluvias provoca que el suelo no sea capaz de retener la mayor parte de la misma y el excedente provoca la escorrentía y la lixiviación de los plaguicidas aplicados, más aún si la aplicación ha tenido lugar poco antes de las precipitaciones (Wauchope y Myers, 1985; Hermosín et al., 2013).

Las *prácticas agrícolas* que se llevan a cabo en el suelo alteran su composición y su estructura, mediante la adición de residuos y los sistemas de laboreo. La adición de materia orgánica puede influir en la mayoría de los casos en la reducción de la lixiviación de plaguicidas por un aumento en la adsorción (Barriuso y Koskinen, 1996; Cox et al., 1997b; Cox et al., 1999a). Incluso las barreras verdes utilizadas para proteger de la erosión y las pérdidas por escorrentías, pueden tener un efecto sobre la lixiviación (Arora et al., 2010). Las formas y dosis de aplicación del plaguicida serán también factores claves en su lixiviación.

### **I.2.1.4. Otros procesos de transporte**

#### **I.2.1.4.1. Escorrentía**

La escorrentía se puede definir como las aguas que discurren en la superficie terrestre producidas cuando la precipitación o el riego superan la tasa de infiltración de agua del suelo, debido a la saturación del mismo. Numerosos autores han demostrado que la escorrentía supone una de las mayores fuentes no localizadas de contaminación de aguas superficiales por la agricultura (Kuivila y Foe, 1995; Schulz, 2001; Schulz y Dabrowski, 2001; Dabrowski et al., 2002; Hermosín et al., 2013). Ésta depende del modo de aplicación del plaguicida, de sus propiedades físico-químicas (como solubilidad en agua, vida media y Koc) y de las variables que afectan a su captación por los suelos (Merkle y Bovey, 1974; Capel y Larson, 2001).

Según Wauchope (1978), las pérdidas de compuestos en aguas de escorrentía tienen lugar en disolución, para compuestos con solubilidad alta, o adsorbido en el coloide móvil del suelo, para compuestos poco solubles en agua. El proceso de escorrentía y el de lixiviación están muy relacionados; durante la escorrentía los plaguicidas son transportados lateralmente por las aguas superficiales que no contribuyen a la lixiviación de éstos por el perfil del suelo y ambos son especialmente graves cuando las lluvias coinciden con la época de aplicación por el ciclo del propio cultivo, como ocurre en el olivar en Andalucía en años lluviosos (Hermosín et al., 2013).

#### **I.2.1.4.2. Volatilización**

La volatilización es en el proceso por el cual un compuesto se evapora hacia la atmósfera desde otro compartimento ambiental. Este proceso puede ser importante para compuestos que tengan una presión de vapor alta, que su época de aplicación coincida con altas temperaturas y que se apliquen en las partes aéreas del cultivo o en suelo limpio. Además, este proceso puede ser una fuente de contaminación difusa remota, ya que una vez en la atmósfera el

plaguicida puede viajar a través de kilómetros, depositarse y/o caer con la lluvia a distancias de cientos e incluso miles de kilómetros, lo que explica que se hayan encontrado algunos plaguicidas en los polos de la Tierra (Glotsfeld y Schomburg, 1998).

La volatilización puede ser el mecanismo más importante para la pérdida de compuestos químicos en los suelos, produciéndose fundamentalmente durante la aplicación y sobre el plaguicida que permanece en la superficie del suelo o de la vegetación (Thomas, 1982). Para algunos compuestos altamente volátiles, las pérdidas por volatilización pueden llegar hasta el 90% del compuesto inicialmente aplicado (Taylor y Spencer, 1990).

### **I.2.1.4.3. Difusión**

La difusión se define como el fenómeno mediante el cual un compuesto se traslada de un punto a otro dentro de una misma fase (suelo o agua). Los factores más importantes que condicionan en mayor medida la difusión de un plaguicida son su solubilidad en agua, la presión de vapor y su peso molecular.

La difusión también depende de las propiedades de la fase en la cual se desplaza el compuesto, como la temperatura, la fuerza iónica y, en el caso del suelo, el contenido de humedad y la porosidad. En el suelo esto ocurre fundamentalmente en la solución del suelo y algo menos en fase gaseosa, pero no obstante es responsable de buena parte de la movilidad que ocurre en sentido distinto del vertical.

### **I.2.1.4.4. Absorción**

La absorción en plantas y organismos es otro de los procesos de transporte que se dan en el suelo y constituye en parte la finalidad de la aplicación de los productos fitosanitarios a los suelos, para eliminar los parásitos, virus, bacterias o insectos diana y, en parte, porque pueden ser absorbidos por otros no diana. Esta segunda vía puede ser un medio natural de descontaminación, pero casi siempre conlleva un proceso de biodegradación metabólica, por lo que es un proceso que participa tanto del transporte como de la transformación. De hecho, aquellos residuos que no son metabolizados pueden quedar asociados a la planta y con ella caer posteriormente al suelo o ser transportados a otro lugar con la cosecha o los restos del cultivo (Khan, 1982).

Este es un proceso que también se ve afectado por la adsorción, ya que dependiendo de lo fuerte o débil que ésta sea a los componentes del suelo, la biodisponibilidad o accesibilidad de la molécula a los organismos vivos será inversamente proporcional, como se ha demostrado en diversos casos (Hull,

1970; Cabrera et al., 2008; Trigo et al., 2010). Este aspecto será abordado de nuevo en el proceso de biodegradación.

### **I.2.2. Procesos de transformación**

Los procesos de transformación o degradación son los que transforman o degradan a los compuestos aplicados en productos que pueden ser de igual, menor o mayor toxicidad (Cheng y Lehmann, 1985). Estos procesos están influenciados por distintos factores como la temperatura, la intensidad y duración de la luz solar, el pH o la composición del suelo y, por supuesto, por la adsorción.

Podemos distinguir tres tipos de procesos de degradación o transformación, atendiendo a su naturaleza, origen y/o detonante: degradación química, biológica y fotolítica.

#### **I.2.2.1. Degradación química**

La degradación química es provocada por aquellas reacciones químicas que afectan a un pesticida una vez aplicado al suelo y que pueden tener desde naturaleza hidrolítica y redox, como las más abundantes, a las menos frecuentes de condensación, esterificación, etc. Los factores que afectan a estos procesos son el pH, el potencial redox, la temperatura y la composición de la disolución y de la fracción coloidal del suelo (Khan, 1980). También dependerán de la propia naturaleza química del plaguicida y su susceptibilidad a sufrir dichas reacciones.

La adsorción de plaguicidas a los coloides del suelo y a la MOS puede tener un doble efecto, ya que puede proteger a los plaguicidas de la degradación química o puede potenciarla. Los cationes de cambio de los minerales de la arcilla y el agua de hidratación participan en muchas reacciones de degradación catalizadas por la superficie (Russell et al., 1968; Laird, 1996). La presencia de hierro y el tipo de estructura mineral u orgánica en la que esté presente (Cornejo et al., 1983) y las sustancias húmicas también han sido implicadas en la hidrólisis de la atrazina (Gamble y Khan, 1985).

#### **I.2.2.2. Biodegradación**

Los procesos de biodegradación de plaguicidas se deben fundamentalmente a los procesos de asimilación-metabolización por parte de la microflora del suelo (bacterias y hongos). Los microorganismos capaces de degradar a los plaguicidas se encuentran tanto en los suelos y medios acuáticos, como en aguas residuales, además de que un gran número y diversidad de



microorganismos pueden ser encontrados en suelos de cultivo (Bordjiba et al., 2001), tanto de tipo beneficioso como competidores o que puedan ser causantes de algún trastorno o enfermedad para las plantas u otros organismos vivos. La tasa de biodegradación normalmente aumenta con la temperatura y humedad del suelo hasta capacidad de campo (Parker y Doxtader, 1983; Allen y Walker, 1987; Yen et al., 2003), debido al aumento de la población microbiana.

Las transformaciones enzimáticas forman parte de los procesos de biodegradación en el suelo y para la mayoría de los plaguicidas son generalmente debidas a reacciones de oxidación, reducción o de hidrólisis. Las reacciones hidrolíticas y de oxidación pueden ser producidas por hongos y bacterias, mientras que las de reducción son reacciones más típicas de bacterias. Las reacciones oxidativas tienen lugar únicamente en presencia de oxígeno, las reductivas en condiciones anaerobias y las hidrolíticas bajo ambas condiciones.

La adsorción reduce la biodegradación, ya que las moléculas adsorbidas no suelen estar disponibles para los microorganismos. El efecto de la materia orgánica en los procesos de biodegradación es doble:

- Al adsorber el plaguicida lo protege de la biodegradación (Shea y Weber, 1983; Mersie y Foy, 1985; Walker et al., 1989; Ainsworth et al., 1989; Barriuso et al., 1997; Guo et al., 2000).

- La materia orgánica puede ser un sustrato nutritivo para la microflora, dando lugar un aumento de ésta a un aumento de la población microbiana y, por tanto, a una mayor tasa de degradación de plaguicidas biodegradables (Walker y Welch, 1989; Nair y Schnoor, 1994; Cox et al., 1999b; Hole et al., 2001; Albarrán et al., 2003).

Según Scow y Hutson (1992), la adsorción influye en la cinética de la biodegradación, no sólo modificando la concentración del compuesto químico en la disolución del suelo, sino también mediante una inducción directa de las respuestas regulatorias de los microorganismos dependientes de la concentración del plaguicida en el medio. Sin embargo, en algunos casos, se ha visto que la toxicidad ha sido el principal factor controlador de la biodegradación (Martins y Mermoud, 1998). En estos casos, la adsorción reduciría la concentración del producto químico en la disolución del suelo hasta niveles no tóxicos e, indirectamente, favorecería la biodegradación (Van Loosdrecht et al., 1990).

En el caso de suelos sometidos al tratamiento con enmiendas orgánicas, el comportamiento de los plaguicidas varía con la naturaleza de la enmienda y el efecto frente a la actividad microbiana del suelo (Alvey y Crowley, 1995; Abdelhafid et al., 2000; Perrin-Ganier et al., 2001). Otro fenómeno de interés con respecto a la biodegradación de plaguicidas es el fenómeno de "degradación acelerada", que podemos definirlo como la capacidad de adaptación de los

microorganismos del suelo, dando lugar a una metabolización rápida tras tratamientos repetitivos (Felsot y Shelton, 1993; Cox et al., 1996; Davison y McKay, 1999; Beigel et al., 1999; Abdelhafid et al., 2000), lo que de hecho podría ser empleado para la descontaminación de un suelo afectado por el derrame de un plaguicida.

### **I.2.2.3. Fotodegradación**

La fotodegradación consiste en la transformación del plaguicida como consecuencia de la energía de la luz solar (Horspool, 1970). Esta reacción es importante en los primeros milímetros del suelo, en la superficie de las plantas y en ecosistemas acuáticos, donde los plaguicidas pueden ser transportados en disolución o bien adsorbidos a la materia particulada. Este tipo de reacción depende de la estructura molecular del plaguicida, fundamentalmente de que sea susceptible de degradarse por absorción de la luz.

La fotodegradación puede ser directa, cuando el plaguicida se degrada por la acción directa de la radiación solar, o indirecta, cuando la energía de la radiación solar es absorbida por otros compuestos que luego transmiten esa energía a la molécula del plaguicida o bien dan lugar a especies reactivas intermedias que pueden entrar en reacción con el plaguicida (Mansour et al., 1989; Cox et al., 1996; Aguer et al., 2000). En el caso de la fotólisis indirecta casi siempre actúa como mediador la materia orgánica sólida o soluble del suelo. Los factores que más afectan al proceso de fotodegradación son los relacionados con la energía lumínica, la intensidad y el tiempo de exposición que el plaguicida esté sometido a la radiación solar. También, la presencia de catalizadores fotoquímicos, que pueden favorecer la descomposición, el pH del suelo, el grado de aireación del suelo, el estado físico en el que se encuentra el plaguicida (sólido, disuelto o en estado vapor), el grado de adsorción y la estructura química del plaguicida determinan en gran medida que un plaguicida pueda ser fotodegradado. En otros casos, la adsorción de un plaguicida por los componentes de suelos o sedimentos puede actuar de protección y disminuir la fotodegradación.

### **I.3. Fracción coloidal del suelo: Componentes, propiedades adsorbentes de plaguicidas y sus aplicaciones**

Como se ha ido señalando en la descripción de todos los procesos que afectan a los plaguicidas en los suelos, la adsorción en los sólidos que componen el suelo es la que en gran medida determina la cantidad del compuesto disponible para los demás procesos y este proceso de adsorción ocurre fundamentalmente en la fracción coloidal o arcilla del suelo, por tener asociada

no sólo la mayor parte de la superficie o interfase solido/líquido sino por la propia reactividad superficial de sus componentes (Bailey y White, 1970; Guenzi, 1974; Cheng, 1990; Hayes y Mingelgrin, 1991; Cornejo y Hermosín, 1996; Cornejo et al., 2005), que se pueden agrupar en dos principales tipos:

- \* Inorgánicos: compuestos por la mayoría de los minerales de la arcilla o filosilicatos y por los óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos metálicos, principalmente de hierro y aluminio (Dixon y Weed, 1989)
- \* Orgánicos: se pueden dividir en sustancias húmicas y no húmicas (Hayes y Swift, 1978)

La fracción arcilla o coloidal de los suelos se define como aquella fracción que comprende las partículas de un diámetro inferior a 2  $\mu\text{m}$ . La fracción arcilla presenta una elevada superficie específica y reactividad superficial, por lo que los componentes que la engloban son considerados los principales responsables de las interacciones que tienen lugar entre la fase sólida del suelo y los compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, que a éste llegan. En el suelo, los minerales de la arcilla y los componentes orgánicos no sólo se presentan como partículas aisladas sino también interaccionando entre sí dando lugar a complejos organo-arcillosos que son asociaciones entre las partículas inorgánicas y la materia orgánica. Los fenómenos de asociación son tan comunes que para algunos suelos se ha encontrado que la materia orgánica libre, no asociada a los componentes inorgánicos, supone tan sólo un 10-20% del total (Greenland, 1965). La naturaleza de los complejos organo-arcillosos determina la formación de los agregados del suelo y, por tanto, sus características estructurales (Oades 1984).

Los procesos de interacción entre los coloides naturales del suelo y los compuestos antropogénicos, orgánicos e inorgánicos, que llegan al suelo, han marcado las pautas en los últimos años sobre la búsqueda de posibles parámetros a emplear en modelos para predecir el comportamiento de plaguicidas (Karichoff, 1981; Hermosín et al., 2000; Cornejo et al., 2005). La relevancia de estos coloides naturales ha servido de modelo para sintetizar complejos organo-minerales para emular o aproximar los comportamientos que se dan en los suelos (Pusino et al., 1994; Celis et al., 1997a, 1999a; Cruz Guzmán et al., 2003) y para diseñar y obtener adsorbentes de pesticidas y otros contaminantes orgánicos con diversas aplicaciones medioambientales, de tipo correctoras o de prevención de la contaminación (Cornejo et al., 2008).

Para intentar evitar los procesos de pérdidas del componente activo de los plaguicidas, así como los que conllevan la contaminación de los diversos compartimentos medioambientales, se han sintetizado diferentes complejos organoarcillosos, para los cuales determinados plaguicidas presentan una alta capacidad de adsorción (Margulies et al., 1994; El-Nahhal et al., 1998; Gerstl et

al., 1998; Cox et al., 2000a; Undabeytia et al., 2000; Celis et al., 2002a; Celis et al., 2002b; Trigo et al., 2009; Gámiz, 2012). De esta manera se ha conseguido evitar su lixiviación a través del perfil del suelo y el consiguiente problema de contaminación, pero esto será tratado con más detalle más adelante. El aumento de los componentes orgánicos en los suelos mediante la adición de residuos también es un manejo estudiado para evitar la contaminación de acuíferos. Los primeros estudios sobre el efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas en el comportamiento de plaguicidas se remontan a finales de los años 80 (Azam et al., 1988).

Las asociaciones entre componentes para dar complejos organominerales se dan de forma natural en los suelos. Como se ha mencionado anteriormente, estos complejos surgen de diversos procesos físico-químicos que afectan a la unión entre los componentes orgánicos e inorgánicos. Los óxidos metálicos se encuentran asociados a las superficies de los minerales de la arcilla o filosilicatos (Davidtz y Summer, 1965; Roth et al., 1968) y la materia orgánica se fija a los bordes de las partículas de arcilla y a los revestimientos de óxidos metálicos confiriendo propiedades hidrofóbicas a las superficies minerales (Murphy et al., 1994; Celis, 1996; Celis et al., 1997a). Según el orden y disposición o componente dominante en la superficie, el resultado final es muy diverso (Cornejo y Hermosín, 1996).

### **I.3.1. Arcillas o filosilicatos y organoarcillas**

#### **I.3.1.1. Filosilicatos**

Los filosilicatos, comúnmente denominados arcillas, son constituyentes esenciales de los suelos y sedimentos debido a que son, en su mayor parte, productos finales de la meteorización de los silicatos, aunque también se encuentran en yacimientos enriquecidos en algunos de ellos. Los filosilicatos o silicatos laminares son los más abundantes y, en mucha menor proporción, se encuentran también los fibrosos.

Los silicatos laminares presentan una estructura basada en el apilamiento de 2 tipos de láminas: a) de **tipo 1:1** formada por una capa de tetraedros de silicio condensada a otra de octaedros de aluminio y b) **tipo 2:1** formados por dos capas de tetraedros de silicio condensadas, una a cada lado, a una capa de octaedros. Los grupos tetraédricos  $(\text{SiO})_4^{4-}$  se unen compartiendo tres de sus cuatro oxígenos con otros vecinos formando capas, de extensión infinita y fórmula  $(\text{Si}_2\text{O}_5)^{2-}$ , que constituyen la unidad fundamental de los filosilicatos. En ellas los tetraedros se distribuyen formando hexágonos. El silicio tetraédrico puede estar sustituido, en parte, por  $\text{Al}^{3+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ . En las capas octaédricas algunos  $\text{Al}^{3+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  se pueden sustituir por Fe, Li, Cr, Mn, Ni, Cu o Zn. Ambos tipos de láminas se representan en la Fig. I.4.



2:1

Existe un grupo (2:1:1) con una estructura similar a la de los minerales 2:1, al cual pertenecen las cloritas, en el que el balance de carga se mantiene por la presencia, en el espacio interlaminar, de grupos hidroxilos coordinados octaédricamente, similares a las capas octaédricas. Por tanto, su capacidad de intercambio catiónico es nula, al igual que su capacidad de hinchamiento (Grim, 1968; Karathanasis et al., 1983; Ezzaim et al., 1999).

Las importantes aplicaciones industriales de este grupo de minerales radican precisamente en sus propiedades físico-químicas:

- \* Su extremadamente pequeño tamaño de partícula (inferior a 2  $\mu\text{m}$ )
- \* Su morfología laminar (filosilicatos)
- \* Las sustituciones isomórficas, que dan lugar a la aparición de carga en las láminas y a la presencia de cationes en el espacio interlaminar fácilmente intercambiables en muchos casos
- \* Su altísima superficie específica

Los minerales del tipo 2:1 reciben el nombre genérico de **esmeclitas**, que agrupa diversas variantes que se diferencian tanto en el origen de la carga o capa donde se dan las sustituciones isomórficas (tetraédrica u octaédrica) y en la naturaleza de esta capa octaédrica según sea aluminica (dioctaédricas) o magnésica (trioctaédricas). De ahora en adelante nos referiremos a la esmeclita del tipo montmorillonita, de fórmula genérica  $(\text{Na,Ca})_{0.3}(\text{Al,Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ , ya que es la que vamos a estudiar en este trabajo.

Las esmeclitas, gracias a sus superficies internas accesibles y expandibles, presentan muy buenas propiedades adsorbentes para diversos contaminantes. Poseen una estructura laminar con carga negativa permanente, compensada por cationes interlaminares que otorgan una variedad de sitios de adsorción, tanto en las superficies externas como en el espacio interlaminar (Lagaly, 1994, 2001). Los centros activos de los filosilicatos con respecto a la adsorción de moléculas orgánicas e inorgánicas, son determinados puntos estructurales (Fig. I.5).

- Cationes de cambio hidratados en la interlámina y en los bordes del mineral. Los sitios donde se localiza la carga, procedente de las sustituciones isomórficas, están compensados por cationes de cambio que se asocian a moléculas de agua y tienen un fuerte carácter hidrofílico (Mortland, 1970).
- Grupos silanoles y aluminosilos de los bordes de ruptura. Originados por la ruptura de los enlaces Si-O-Si y Al-O-Si (Cerezo et al., 2003), son sitios de carga variable dependiendo del pH del medio.
- Grupos siloxano laminares de los planos basales. Estas zonas de la superficie de los planos basales externos o interlaminares comprendidos entre sitios cargados tienen carácter hidrofóbico (Jaynes y Boyd, 1991)

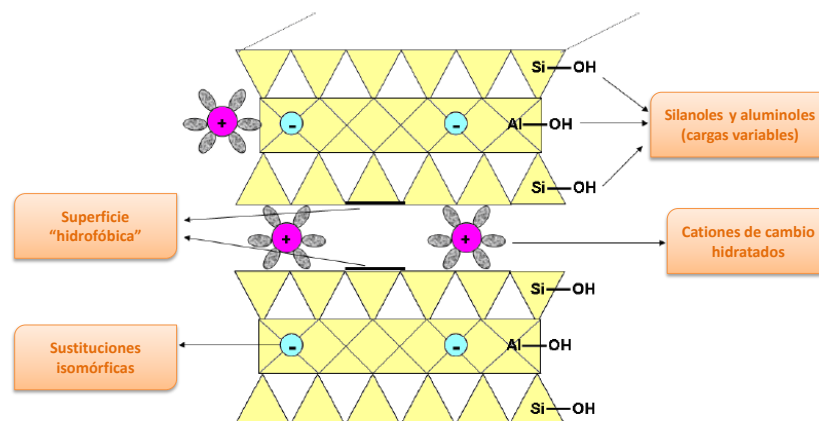


Fig. I.5. Centros activos de un filossilicato en relación con la adsorción de plaguicidas.

Los mecanismos de interacción con los plaguicidas dependen fundamentalmente de las características de carga del plaguicida:

- *Plaguicidas catiónicos y protonables.* Son adsorbidos mediante procesos de intercambio iónico. Su adsorción y desorción mantiene los patrones de las interacciones electrostáticas entre los cationes y las cargas superficiales del mineral de la arcilla (Philen et al., 1971). Se ha demostrado cómo las arcillas son buenos adsorbentes de plaguicidas catiónicos y polares (Hermosín y Pérez-Rodríguez, 1981; Cox et al., 1997a) interaccionando mediante diferentes mecanismos como el intercambio catiónico, enlaces polares y de hidrógeno (como se ha mencionado anteriormente).
- *Plaguicidas aniónicos y ácidos débiles.* Los compuestos aniónicos son repelidos por las superficies con carga negativa de los filossilicatos, dando como resultado una adsorción pequeña o nula (Celis et al., 1999a). En el mineral de la arcilla existen sitios de adsorción para los plaguicidas aniónicos, aunque no son muy numerosos. Pueden unirse a los bordes cargados positivamente (si el pH < 5), mediante puentes de hidrógeno, a metales polivalentes en los sitios de intercambio o, con las condiciones apropiadas, mediante la dominancia de la atracción por fuerzas de Van der Waals (Lagaly, 2001).
- *Plaguicidas neutros: hidrófobos o polares.* Los compuestos orgánicos hidrófobos no presentan una alta afinidad por los filossilicatos, debido al ambiente hidrofílico de la superficie del mineral creado por los cationes hidratados interlaminares (Jaynes y Vance, 1996). Las fuerzas de Van der Waals son más fuertes cuando el plaguicida puede aproximarse a los átomos de oxígeno de la superficie de siloxano del mineral (regiones hidrofóbicas). Los plaguicidas con

grupos funcionales polares (-OH, =O, -NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>) son retenidos mediante fuerzas electrostáticas (ión-dipolo ó dipolo-dipolo) o enlaces de coordinación.

Las esmectitas poseen una elevada superficie específica y una capacidad de intercambio catiónico muy importante; por esta razón se han utilizado como soporte inorgánico en la síntesis de complejos organoarcillosos. Estas propiedades estructurales y funcionales de dichos materiales los han convertido en interesantes materiales en cuanto a las posibles aplicaciones que presenta su escala nanométrica (Cuadros, 1997; Johnston, 2010; Darder et al., 2003; An and Dultz, 2007; Aguzzi et al., 2010), lo que las ha hecho un nuevo objeto de extraordinaria actualidad en investigación, adquiriendo un nuevo concepto de aplicación.

### **I.3.1.2. Organoarcillas**

La facilidad con la que los cationes interlaminares de la montmorillonita y otras esmectitas se cambian por cationes orgánicos se conoce desde hace mucho tiempo (Smith, 1934), pero su posible aplicación como adsorbentes de sustancias orgánicas tóxicas y pesticidas es relativamente reciente (Margulies et al., 1994; Jaynes y Boyd, 1991; Hermosín y Cornejo, 1992, 1993; Lagaly, 2001; Cornejo et al., 2004). La posibilidad de modificación de las propiedades superficiales de las arcillas mediante sustitución de los cationes inorgánicos naturales de su espacio interlaminar por cationes orgánicos, mejora las propiedades adsorbentes del mineral para compuestos no iónicos hidrofóbicos y compuestos ácidos (Jaynes y Boyd, 1991; Hermosín y Cornejo, 1992, 1993).

Las organoarcillas son filosilicatos de tipo expansible modificados mediante sustitución de sus cationes interlaminares inorgánicos por cationes orgánicos. En realidad estas organoarcillas son una "reproducción" o modelo de los complejos organo-arcillosos del suelo y, dependiendo del tipo de catión orgánico, de la carga laminar de la arcilla y del grado de saturación, el material resultante es de una gran diversidad. Estos cationes orgánicos van desde aquellos de tamaño pequeño y discreto que potencian la hidrofobicidad de la propia capa octaédrica de la lámina, hasta altamente voluminosos como los alquilamonios cuaternarios de cadena larga, los funcionalizados (Margulies et al., 1994; Celis et al., 2000; Rodríguez-Cruz et al., 2007) e incluso los polímeros (Theng, 1979, 1982; Darder et al., 2003; Gámiz et al., 2010; Celis et al., 2012) que según su proporción pueden adsorberse en el espacio interlaminar o formando recubrimientos en la superficie externa.

Las posibles aplicaciones de las arcillas y organoarcillas como adsorbentes de plaguicidas se exponen a continuación:



- **Filtros para depuración de aguas.** La aplicación de estos complejos en el ámbito de la remediación de ecosistemas acuáticos contaminados, ha sido uno de los primeros campos de investigación de este tipo de compuestos (Hermosín y Cornejo 1992; Socias-Viciano et al., 1998; Celis et al., 1999b; Aguer et al., 2000; De Martino et al., 2011).
- **Soportes en formulaciones de liberación controlada de plaguicidas.** Para plaguicidas muy solubles y para evitar las pérdidas por transporte, principalmente escorrentía y percolación, se han sintetizado complejos o formulaciones de liberación lenta en las cuales sólo una parte del ingrediente activo del plaguicida se encuentra en una forma inmediatamente disponible, mientras que la mayor parte se encuentra atrapado o adsorbido sobre un soporte inerte, en este caso arcilla u organo-arcilla, que lo va liberando gradualmente con el tiempo (Fernández-Pérez et al., 1998; Celis et al., 2000, 2002a; Undabeytia et al., 2003). El empleo de arcillas modificadas y sin modificar como soportes para la liberación controlada de plaguicidas ha sido estudiado ampliamente (Margulies et al., 1994; El-Nahhal et al., 1998; Gerstl et al., 1998; Cox et al., 2000a; Undabeytia et al., 2000; Celis et al., 2002a; Celis et al., 2002b; Trigo et al., 2009). Han sido muchos los estudios que han descrito la diversidad de interacciones entre las organoarcillas y pesticidas (Boyd et al., 1988; Hermosín et al., 1993; Zhao et al., 1996; Celis et al., 1999b, 2000; Nir et al., 2000; Cox et al., 2002; Carrizosa et al., 2003), y en base a esta diversidad de tipo de interacción hoy se está cerca de preparar un adsorbente “a la carta” según el tipo de molécula, pesticida o fármaco, del que se quiera diseñar una formulación de liberación controlada (Cornejo et al., 2005). El uso de estas formulaciones reduce la pérdida del producto activo del plaguicida por transporte (lixiviación y escorrentía), por lo que supone una reducción de la cantidad de producto, ahorro de energía, de mano de obra y económico al agricultor gracias a la reducción de las aplicaciones, un aumento de la seguridad en la aplicación y un descenso de efectos perjudiciales (Trigo, 2010).
- **Barreras inmovilizantes de plaguicidas: uso como enmiendas agrícolas.** Trabajos recientes han demostrado la eficiencia de las organoarcillas como barreras para retener plaguicidas en suelos. Voudrias (2002) demostró mediante modelos predictivos que el herbicida diurón y el benceno redujeron su lixiviación en suelos enmendados con una bentonita modificada con HDTMA. Rodríguez-Cruz et al. (2007) realizaron estudios de lixiviación en columnas de suelo encontrando que barreras compuestas por distintos minerales de la arcilla (montmorillonita, kaolinita, paligorskita) modificados con octadeciltrimetilamonio (ODTMA) redujeron drásticamente la

lixiviación de varios plaguicidas, llegando casi a su inmovilización. También se emplean como base activa de lechos fluidizados.

La modificación de las arcillas con cationes orgánicos es un buen ejemplo de uso de materiales naturales para intentar mejorar la afinidad de distintos plaguicidas (Hermosín y Cornejo, 1993; Carrizosa et al., 2000; Prost y Yaron, 2001; Undabeytia et al., 2003; Cornejo et al., 2008; Radian y Mishaël, 2008) y controlar la desorción una vez aplicados en el medio.

Dependiendo de la densidad de carga laminar y del tamaño de los radicales, los cationes orgánicos pueden adoptar distintas configuraciones en la interlámina (Jaynes y Vance, 1996) (Fig. I.6):

- \* Monocapa
- \* Bicapa
- \* Pseudotrimolecular o parafínica

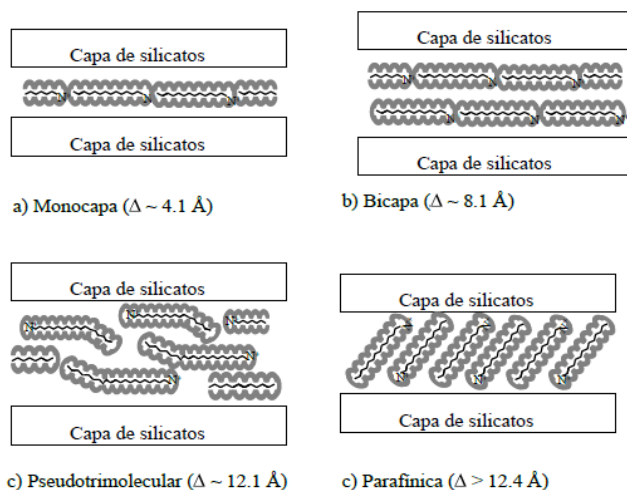


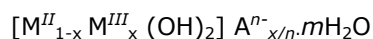
Fig. I.6. Posibles disposiciones de los cationes orgánicos en el espaciado laminar de las organoarcillas y magnitud de la distancia interlaminar ( $\Delta$ ).

### I.3.2. Hidrotalcita y organohidrotalcitas

El mineral hidrotalcita se descubrió a mediados del siglo XIX y posteriormente fue sintetizado por Feitknecht y Fischer (1935) mediante reacción entre disoluciones diluidas de sales metálicas de iones divalentes y

trivalentes con bases. A la estructura resultante se le dio el nombre de "estructura de doble lámina" (Bruna, 2010).

Los materiales tipo hidrotalcita, también conocidos como arcillas aniónicas o hidróxidos dobles laminares (HDLs), son sólidos básicos bidimensionales de composición o fórmula empírica siguiente (Cavani et al., 1991):



donde,

$M^{II} = Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}$ ,  $M^{III} = Al^{3+}, Fe^{3+}, Cr^{3+}$ ,  $A^{n-} = CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, Cl^-$  y  $x$  varía entre 0.22 y 0.33.

Estas hidrotalcitas o arcillas aniónicas están formadas por láminas de hidróxidos metálicos cargados positivamente por las sustituciones isomórficas que se producen en los centros octaédricos, de cationes divalentes por cationes trivalentes. Estas sustituciones generan una carga positiva en la lámina que se compensa mediante la introducción de aniones inorgánicos más o menos hidratados en la interlámina (Fig. I.7) y de ahí su denominación de arcillas aniónicas, principal diferencia frente a las arcillas catiónicas (Fig. I.8).

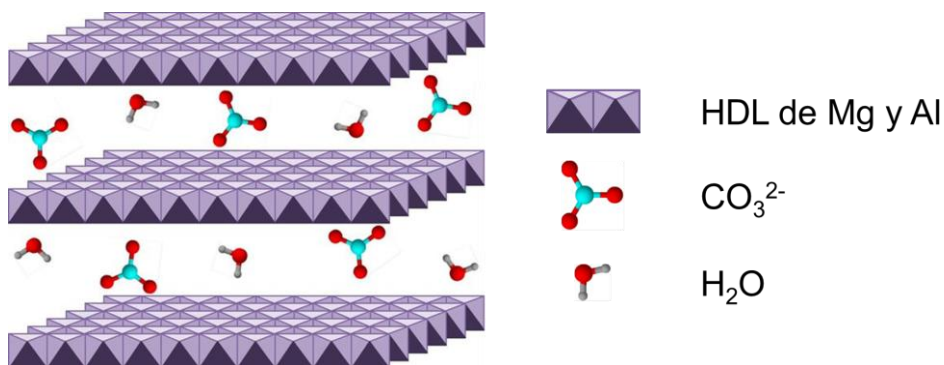


Fig. I.7. Estructura de un hidróxido doble laminar

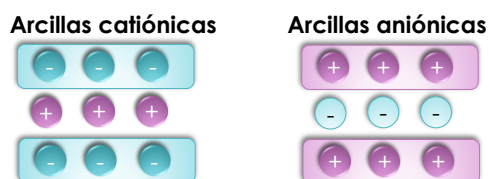


Fig. I.8. Esquema comparativo de la estructura de las arcillas catiónicas y aniónicas.

Aunque las propiedades de adsorción de los hidróxidos dobles laminares se asemejan a las de las esmectitas, principalmente por la existencia de un espacio interlaminar dilatado para el acceso de moléculas polares e iónicas, presentan una mayor densidad de carga laminar. Como consecuencia, las láminas de brucita interaccionarán con los aniones mediante fuerzas electrostáticas fuertes, por lo que la expansión de las láminas estará más impedida en comparación con las esmectitas (Choy et al., 2007). En la actualidad, se han publicado numerosos trabajos sobre la síntesis, estructura y aplicaciones de este tipo de compuestos debido al creciente interés por sus importantes y numerosas aplicaciones, gracias a su fácil síntesis y a ser productos económicos (Reichle, 1986; Cavani et al., 1991; Vaccari, 1999; Cornejo et al., 2000; Ulibarri y Hermosín, 2001; Rives, 2001; Wypych y Satyanarayana, 2004; Rives et al., 2010; Bruna, 2010).

Otra característica de estos tipos de arcilla es la estabilidad que presentan hasta  $\sim 400^\circ\text{C}$ , temperatura a la cual se descarbonatan, formando  $\text{Mg}_3\text{AlO}_4$  (Brindley y Kikkawa, 1980; Miyata, 1983; Ulibarri y Hermosín, 2001; Cornejo et al., 2007; Bruna, 2010); este proceso es reversible en presencia de disoluciones acuosas (Fig. I.9).

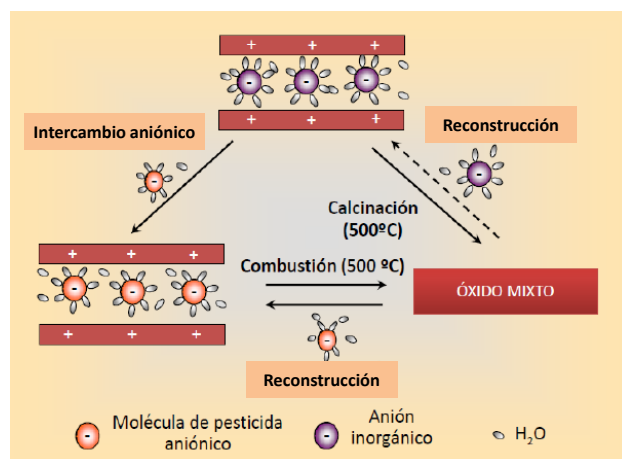


Fig. I.9. Mecanismos de adsorción de aniones orgánicos en los hidróxidos dobles laminares y su reciclabilidad (Ulibarri y Hermosín, 2001)

La reversibilidad de los productos de calcinación de la hidrotalcita otorga un carácter innovador y versátil para la creación de materiales (organohidrotalcitas) potencialmente aplicables en los procesos industriales de muy diversa forma (Cavani et al., 1991; Li y Duan, 2005; Del Hoyo, 2007; Cornejo et al., 2008):

- \* Área superficial específica elevada ( $100 - 300 \text{ m}^2/\text{g}$ ).
- \* "Efecto memoria", permite la reconstrucción de la estructura laminar original, tras ser calcinada a  $500^\circ\text{C}$ , mediante el contacto con disoluciones acuosas en presencia de determinados aniones.

- \* Distribución homogénea de los iones metálicos en los productos de calcinación.
- \* Alta capacidad de intercambio aniónico.

En la Fig. I.10 se muestran algunos de los campos de aplicación de los HDLs, resultantes de sus peculiares propiedades físico-químicas que, junto a la facilidad para ser sintetizados, les confiere una gran flexibilidad para ser aplicadas dentro de diversos campos como: adsorción, catálisis, medicina, fotoquímica, etc. (Cavani et al., 1991). Dicha versatilidad se debe fundamentalmente al tamaño y estructura de tipo coloidal, de composición química laminar modificable fácilmente en el laboratorio y a la variabilidad adicional que les proporciona el anión interlaminar.

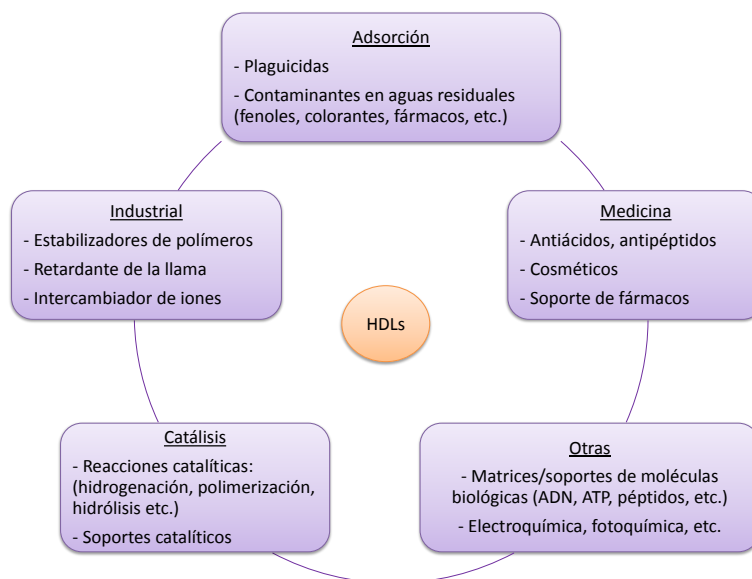


Fig. I.10. Principales aplicaciones industriales de la hidrotalcita y de sus productos calcinados (Cavani et al., 1991).

Los HDLs y sus productos de calcinación han sido estudiados en los últimos años como unos satisfactorios adsorbentes para la descontaminación de aguas (Houri et al., 1998; Kovanda et al., 1999), dada su capacidad de albergar una amplia variedad de especies aniónicas de diversa naturaleza, atrapando contaminantes inorgánicos, como son los nitratos y fosfatos causantes de los problemas de eutrofización en aguas naturales (Shin et al., 1996; Legrouri et al., 1999; Gillman, 2010), iones con actividad radioactiva de aguas residuales (Kang et al., 1996; Toraishi et al., 2002), diversos oxoaniones como arseniato,

cromato y vanadato (Kovanda et al., 1999), aniones monoatómicos como el  $\text{Cl}^-$  procedente de aguas ácidas (Kameda et al., 2000), etc.

También han sido estudiados como adsorbentes de contaminantes orgánicos aniónicos como los fenoles, un importante grupo de contaminantes que, de acuerdo al rango de pH típico de los compartimentos ambientales, suelen encontrarse frecuentemente en aguas subterráneas como fenolatos. Se pueden citar el 2,4,6-triclorofenol (TCP) o el 2,4,6-trinitrofenol (TNP) (Hermosín et al., 1993; Ulibarri et al., 1995; Hermosín et al., 1996), 2,4-dinitrofenol (DNP) y 2 metil-4,6-dinitrofenol (Chaara et al., 2010). Surfactantes como el dodecildibenzosulfato (SDBS), octilsulfato (SOS), o el 4-octilbenzenosulfonato (SOBS) (Pavlovic et al., 1997; You et al., 2002), moléculas derivadas de ácidos orgánicos (Crepaldi et al., 2002; Cardoso et al., 2003) y tintes sintéticos (Orthman et al., 2003) son otros contaminantes encontrados en aguas naturales susceptibles de ser atrapados por los HDLs y sus productos calcinados.

Estudios sobre los HDLs como adsorbentes de plaguicidas han demostrado cómo son unos buenos adsorbentes de plaguicidas aniónicos. Dos factores importantes que intervienen en la adsorción son la carga y la naturaleza del anión interlaminar original (Hermosín et al., 1993; Hermosín et al., 1996; Celis et al., 1999b; Sánchez-Martín et al., 1999; Li et al., 2004; Cornejo et al. 2007; Bruna, 2010).

La capacidad de adsorción de los HDLs para moléculas neutras de carácter hidrofóbico es escasa; sin embargo, y de forma equivalente a las arcillas catiónicas (Barrer, 1989; Jaynes y Boyd, 1991), la intercalación de moléculas orgánicas aniónicas en HDLs cambia la naturaleza de su superficie de hidrofílica a hidrofóbica. Este simple cambio en la naturaleza de la fase interlaminar permite la adsorción de moléculas no iónicas o de baja polaridad sobre este tipo de compuestos (organohidrotalcitas), de manera semejante a las organoarcillas (Mortland et al., 1986; Hermosín y Cornejo, 1992; Nir et al., 2000).

No obstante, los estudios sobre hidrotalcitas como soportes de plaguicidas son muy escasos. La poca bibliografía encontrada utiliza hidrotalcitas inorgánicas intercaladas con plaguicidas aniónicos (Chaara et al., 2011), no existiendo prácticamente información sobre hidrotalcitas modificadas con aniones orgánicos para ser empleadas como soportes de plaguicidas (Bruna et al., 2008; Qiu et al., 2009). De cualquier forma, los pocos datos existentes indican que estos materiales también podrían ser empleados para la liberación lenta de plaguicidas (Meng et al., 2005; Bin Hussein et al., 2005; Cardoso y Valim, 2006; Qiu et al., 2009; Bin Hussein et al., 2009).





## **II. Objetivos**





El uso de productos fitosanitarios, junto con otras tecnologías asociadas tanto al suelo como a la planta, ha mejorado la producción agraria en los últimos años, aunque se está lejos de solventar la necesidad actual de la población mundial principalmente por los grandes desequilibrios entre países desarrollados y en vías de desarrollo. Ciñéndonos al empleo de fitosanitarios, la continua investigación en este campo, ha permitido el desarrollo de principios activos cada vez más eficaces y con menos efectos medioambientales secundarios y no deseados, pero éstos aún son un motivo de preocupación debido a la acumulación de compuestos en el medio procedentes de distintas fuentes de contaminación. La preocupación por la pérdida de la calidad de los suelos agrícolas ha ido en aumento en los últimos años debido, en parte, a la contaminación sufrida por productos fitosanitarios y otros compuestos de origen antropogénico. Debido al ciclo natural del agua y a los procesos que rigen el comportamiento de los plaguicidas en el sistema suelo-agua, una vez que estos compuestos llegan al suelo, finalmente alcanzan tanto las aguas superficiales como las subterráneas.

Como se ha mencionado en el capítulo anterior, la fracción arcilla de los suelos, tanto sus componentes minerales como orgánicos, tiene un efecto relevante en la dinámica de los plaguicidas en sistemas suelos-sedimento-agua, principalmente en su movilidad. Los materiales organo-arcillosos, que en cierta forma se inspiran en estos complejos organominerales naturales, se han convertido en focos de gran interés debido a sus propiedades estructurales y funcionales, ya que pueden permitir un cierto manejo de los plaguicidas al añadirlos al suelo.

El punto de partida para esta Tesis Doctoral es que las arcillas, organoarcillas, hidrotalcitas y organohidrotalcitas han sido en los últimos años objeto de estudio como adsorbentes de pesticidas y contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos, apuntándose su posible empleo tanto para la depuración o descontaminación de aguas y suelos, como para portadores en formulaciones controladas de plaguicidas que pretenden minimizar el impacto ambiental de éstos. No obstante, en la mayoría de las organoarcillas y organohidrotalcitas la parte orgánica que se asocia a la arcilla suele ser de tipo sintético, generalmente surfactantes, que pueden introducir compuestos xenobióticos al ser utilizados para fines medioambientales. También se han probado otros de tipo natural como aminoácidos o proteínicos, aunque su corta dimensión limita en muchos casos el poder adsorbente.

Por ello, el actual trabajo enfoca la obtención de adsorbentes derivados de materiales naturales o sintéticos, ecocompatibles, como pueden ser los derivados de las arcillas esmectíticas y aniónicas alumino/magnésicas mediante su combinación con polímeros naturales como el quitosano, los ácidos grasos y la materia orgánica soluble del residuo agroalimentario "alperujo". Si estos compuestos se adsorben en las arcillas catiónicas o aniónicas formando complejos estables, podrían adsorber plaguicidas u otros contaminantes

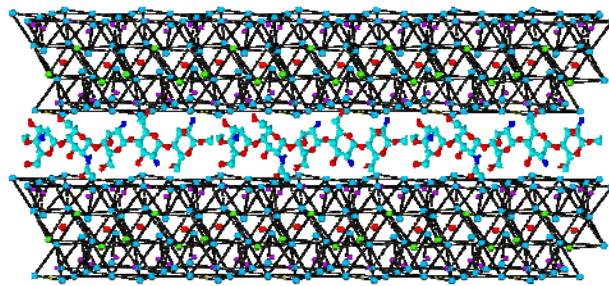
orgánicos. De ser así, estos materiales bioinspirados podrían utilizarse como correctores o protectores medioambientales.

Los objetivos específicos del trabajo pueden resumirse en los siguientes:

- Sintetizar y caracterizar nuevos sistemas organo-arcillosos como materiales adsorbentes de diversos plaguicidas.
- Estudiar la capacidad de adsorción de dichos materiales tanto en medio acuoso como añadidos al suelo en forma de enmendantes en sistemas suelo:agua.
- Desarrollar formulaciones utilizando los materiales como soportes de diferentes plaguicidas y evaluar su capacidad de actuar como sistemas de liberación controlada que prolonguen la eficacia y reduzcan las pérdidas por transporte del plaguicida una vez aplicado al suelo.

En concreto, los nuevos sistemas organo-arcillosos estudiados, que se abordan de forma independiente en los siguientes capítulos de esta memoria, han sido los siguientes:

- I. Complejos de arcilla catiónica (montmorillonita) con el polímero orgánico de origen natural quitosano.
- II. Complejos de arcilla aniónica (hidrotalcita) con ácidos grasos insaturados.
- III. Complejos de arcillas catiónicas y aniónicas con la materia orgánica soluble del residuo agroalimentario que se obtiene durante el procesado de la aceituna para la obtención del aceite de oliva (alperujo).



### III. Estudios del sistema montmorillonita-quitosano



### III.1. INTRODUCCIÓN

La quitina es un polisacárido que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, constituyendo el segundo polímero más abundante después de la celulosa. Está constituida por moléculas de N-acetil-D-glucosamina y forma parte del caparazón de crustáceos, moluscos, insectos y otros seres vivos, siendo su principal defensa ante el contacto con el medio externo.

Fue localizada por primera vez en las setas, en 1811, por el profesor Henri Braconnot en Francia y en 1830 fue aislada en insectos y nombrada quitina. En 1859, el profesor C. Rouget descubrió su principal derivado, el quitosano, al cual le dio el nombre de quitina modificada (Thanou y Junginger, 1998).

El quitosano (Fig. III.1) es una modificación de la quitina, concretamente su forma N-desacetilada. El quitosano se produce comercialmente (Shahidi y Synowiecki, 1991) y su grado de desacetilación, que puede ser determinado por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) o por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), suele estar en el rango de 60-100%.

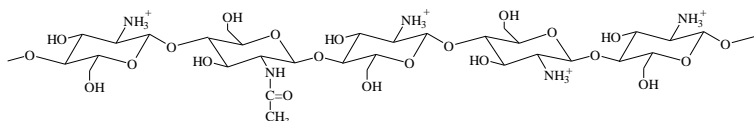


Fig. III.1. Estructura química del Quitosano.

El grupo amino del quitosano tiene un valor de  $\text{pK}_a$  de 6.3, razón por la cual este polímero posee una ligera carga positiva y es soluble en medios ácidos o soluciones neutras con dependencia de la carga del pH y del valor del grado de desacetilación. Se comporta como un bioadhesivo y puede ligarse a superficies cargadas negativamente como las membranas mucosas. Debido a esta propiedad física, permite el transporte de principios activos polares a través de las superficies epiteliales, siendo además biocompatible y biodegradable (Illum y Davis, 1998).

Este compuesto natural ha despertado un gran interés en los investigadores debido a que anualmente se obtienen en el mundo grandes cantidades (120000 toneladas) de quitina de los residuos de mariscos (que tienen un 14-35% de quitina asociado con proteínas) y, además, por el problema medioambiental originado por su lenta degradación. El resultado de estas investigaciones ha sido satisfactorio por el aprovechamiento de la quitina y el quitosano en aplicaciones relacionadas con las industrias farmacéutica, alimenticia y cosmética, entre otras (Shahidi y Synowiecki, 1991).

Algunas aplicaciones de este biopolímero en distintos sectores económicos son las siguientes (Jayakumar et al., 2010):

- **En la industria alimentaria y de bebidas:**

El quitosano se utiliza como aditivo para alimentos (espesante, gelificante, emulsionante o coagulante), como recubrimiento protector de comestibles y como clarificador en las industrias de bebidas (agua, vino, zumos) sin afectar al color (Ausar et al., 2002; Martín-Diana et al., 2009).

- **En el proceso de tratamiento de aguas:**

Es una de las áreas de mayor importancia, ya que tanto la quitina como el quitosano son materiales respetuosos con el medio ambiente. Pueden usarse como: coagulantes primarios para aguas residuales de alta turbidez y alta alcalinidad, como floculante para eliminación de partículas coloidales sólidas y aceites y para la captura de metales pesados en disoluciones acuosas (Sarkar et al., 2006; Renault et al., 2008).

- **En la agricultura:**

La quitina y sus derivados son efectivos en el control de enfermedades y plagas vegetales. Sus mecanismos de acción están vinculados a su estructura química. Pueden actuar sobre el organismo patógeno o inducir mecanismos defensivos en las plantas frente a varias enfermedades vegetales antes y después de la cosecha (Benhamou et al., 1994; Bautista-Baños et al., 2005).

La inquietud por el medio ambiente y, sobre todo, la preocupación por la pérdida de la calidad de los suelos agrícolas y su repercusión ha ido en aumento en los últimos años, debido, en parte, a la contaminación sufrida por productos fitosanitarios y otros compuestos de origen antropogénico (Galán et al., 2003; Romero et al., 2006). Es por esta razón por la que existe un interés cada vez mayor por prevenir en lo posible la contaminación de dichos suelos y preservar su calidad.

En el ámbito de la prevención y remediación de la contaminación, los **bionanomateriales arcillosos** están despertando un gran interés, entre otros motivos, por las diversas aplicaciones que pueden tener relacionadas con la adsorción de diversos tipos de contaminantes. Estos materiales se forman por la asociación de una parte inorgánica (arcillosa) con una molécula o polímero orgánico de origen natural (Saegusa, 1991; Darder et al., 2003; Parbhakara et al., 2007; Jia et al., 2012). Al tratarse de materiales naturales, el uso de este tipo de bionanomateriales en aplicaciones medioambientales presenta la ventaja de provocar un bajo impacto ambiental (Darder et al., 2003).

El quitosano es uno de los biopolímeros naturales que han recibido recientemente un mayor interés para la preparación de bionanomateriales arcillosos (Darder et al., 2003; Darder et al., 2005; Günister et al., 2007; Aguzzi et al., 2010; Bleiman y Mishael, 2010). Se ha sugerido que tanto las propiedades físicas como las funcionales del quitosano pueden mejorar cuando éste se adsorbe sobre los minerales de la arcilla (Darder et al., 2003; An y Dultz, 2007a y b; Wang y Wang, 2007).

Darder et al. (2003) intercalaron quitosano en una montmorillonita saturada con sodio, obteniendo un compuesto compacto y robusto con interesantes propiedades funcionales. El quitosano formaba monocapas o bicapas en el espacio interlaminar de la arcilla, dependiendo de la cantidad relativa de quitosano con respecto a la capacidad de intercambio catiónico (CIC) del mineral.

Estudios posteriores han demostrado que hay una serie de factores, tales como el pH y la temperatura, que pueden afectar al grado y al modo en que el quitosano se asocia con la montmorillonita. Por ejemplo, el  $pK_a$  de los grupos aminos primarios en la estructura del quitosano es de 6.3, por lo que ante un incremento del pH se produce una disminución en el grado de protonación del biopolímero, lo que provoca un aumento de la cantidad adsorbida en la montmorillonita (An y Dultz, 2007a).

La adsorción del quitosano sobre la montmorillonita, particularmente cuando el polímero se encuentra en exceso con respecto a la CIC del mineral de la arcilla, da lugar a estructuras con buenas propiedades para la adsorción de aniones, porque los grupos  $-NH_3^+$  que no están directamente involucrados en la interacción con la superficie de la arcilla pueden actuar como sitios de intercambio aniónico (Darder et al., 2003). Por esta razón, los complejos montmorillonita-quitosano han sido propuestos recientemente para la adsorción de aniones en aplicaciones tales como el desarrollo de sensores potenciométricos o la eliminación de ácido tánico y selenato de las aguas (Darder et al., 2005; An y Dultz, 2007b; Bleiman y Mishael, 2010); sin embargo, estos complejos no se han evaluado aún como posibles adsorbentes de pesticidas.

Según la OMS, un plaguicida es cualquier sustancia o mezclas de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, que está destinada a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales que son perjudiciales para el hombre o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, almacenamiento, transporte o comercialización de productos agrícolas. Frente a sus indiscutibles ventajas relacionadas con la producción de alimentos, su uso es también un motivo de gran preocupación por los efectos adversos que pueden causar sobre el medio ambiente y la salud humana.



Los pesticidas que se encuentran en su forma aniónica al pH de los compartimentos ambientales constituyen un grupo que presenta un riesgo particularmente alto de contaminación de suelos y aguas adyacentes al lugar de aplicación. Esto es debido a que, al ser escasamente retenidos por la materia particulada de suelos y sedimentos (generalmente con una carga superficial también negativa), tienen una gran movilidad y gran capacidad de dispersión en el medio ambiente (Celis et al., 1999a). Por ello, el desarrollo de adsorbentes para prevenir y remediar la contaminación ambiental por plaguicidas aniónicos se ha convertido en un objetivo importante de la investigación (Boyd et al., 1988; Hermosín et al., 1992; Celis et al., 1999b; Cardoso y Valim, 2006; Bruna et al., 2009; Addorisio et al., 2010).

Los minerales de la arcilla son buenos adsorbentes de plaguicidas catiónicos y polares (Hermosín y Pérez-Rodríguez, 1981; Cox et al., 1997a) con los cuales pueden interaccionar a través de diversos mecanismos: intercambio catiónico, enlaces polares, de hidrogeno, etc.; sin embargo, no suelen mostrar mucha afinidad por plaguicidas aniónicos, debido a las repulsiones entre éstos y las cargas superficiales negativas de las arcillas (Lagaly, 2001). La interacción de cationes orgánicos con los minerales de la arcilla puede reducir tales repulsiones, debido a que pueden cambiar la naturaleza de la superficie del mineral de hidrofílica a hidrofóbica, e incluso revertir la carga superficial. Por ello, la modificación de las arcillas con cationes orgánicos es una buena estrategia para mejorar su afinidad por los pesticidas, incluidos los aniónicos, ya que pueden potenciar interacciones hidrofóbicas e incluso iónicas o polares dependiendo de los grupos funcionales del catión modificador (Hermosín y Cornejo, 1993; Carrizosa et al., 2000; Prost y Yaron, 2001; Undabeytia et al., 2003; Cornejo et al., 2008; Radian y Mishaël, 2008).

Teniendo en cuenta que la estructura de los complejos de montmorillonita-quitosano hace que sean materiales potencialmente útiles como adsorbentes de pesticidas, en particular de pesticidas aniónicos, y la ausencia de información al respecto, el objetivo principal de este capítulo ha sido el de evaluar la capacidad de diversos sistemas montmorillonita-quitosano de adsorber pesticidas de diferente naturaleza química, demostrar su particular afinidad por pesticidas aniónicos e ilustrar algunas aplicaciones de los complejos como adsorbentes de dichos pesticidas con el fin de aumentar su eficacia y reducir su impacto ambiental.

## III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### III.2.1. MATERIALES

#### III.2.1.1. Montmorillonita y quitosano

La **arcilla** utilizada para la preparación de los complejos montmorillonita-quitosano fue una montmorillonita de Wyoming (SWy-2) rica en  $\text{Na}^+$  suministrada por The Source Clays Repository of the Clay Minerals Society (Universidad de Purdue, Indiana). Sus principales características se resumen en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Características de la montmorillonita.

Montmorillonita	Origen	CIC <sup>a</sup>	Carga laminar	$d_{001}$ <sup>b</sup>
		(cmol <sub>c</sub> /kg)	(mol/celda unidad)	(nm)
SWy-2	Wyoming (EE.UU)	76	0.66	1.5

<sup>a</sup> CIC: Capacidad de Intercambio Catiónico; <sup>b</sup>  $d_{001}$ : Espaciado basal.

La montmorillonita saturada en sodio (Na-SWy-2) fue preparada a partir de la SWy-2 original mediante tres tratamientos sucesivos con una disolución de NaCl 1 M. La arcilla resultante se lavó repetidamente con agua destilada y, para comprobar que se había lavado correctamente, se realizó el test de nitrato de plata que aseguró la ausencia de cloruros. Una vez saturada en sodio y lavada, la arcilla se liofilizó y se guardó a temperatura ambiente hasta su utilización.

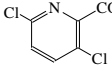
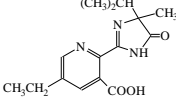
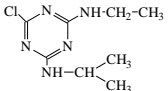
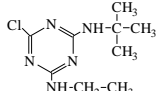
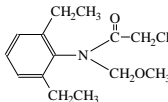
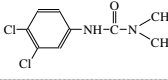
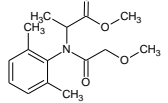
Se utilizaron dos tipos de **quitosano**, uno de bajo peso molecular (LMW) y otro de un peso molecular medio (MMW), ambos suministrados por Sigma-Aldrich (España) con una desacetilación aproximada del 80% (Fig. III.1). El quitosano LMW, cuyo peso molecular está en torno a 50000-190000 g/mol, contiene un número de unidades de glucosamina que oscila entre 250 y 940. El quitosano MMW tiene un peso molecular entre 190000-310000 g/mol y contiene un número de unidades de glucosamina que oscila entre 940 y 1530.

#### III.2.1.2. Plaguicidas

Los plaguicidas utilizados en los experimentos, junto con algunas de sus principales características físico-químicas, se detallan en la Tabla III.2. Los plaguicidas se seleccionaron principalmente por presentar distintas características de tipo físico-químico, principalmente de carga, grupos

funcionales y solubilidades diversas, con el fin de intentar relacionar estas características estructurales con su posible afinidad por los complejos montmorillonita-quitosano. Sus estructuras se muestran en la Fig. III.2 y algunas de sus propiedades se describen a continuación.

Tabla III.2. Algunas características de los plaguicidas estudiados<sup>a</sup>.

Pesticida	Estructura	Peso Molecular	Solubilidad en agua (mg/l)	pK <sub>a</sub>	Kow (P)	Característica de carga
Clopiralida		192.0	143000	2.0	0.002	Ácido
Imazetapir		289.3	1400	2.1 3.9	30	Ácido <sup>b</sup>
Atrazina		215.7	35	1.7	500	Base débil
Terbutilazina		229.7	7	1.9	2500	Base débil
Alacloro		269.8	240	-	1230	Neutro-polar
Diuron		233.1	36	-	750	Neutro-polar
Metalaxil		279.3	7100	-	1.75	Neutro-polar

<sup>a</sup>Datos tomados de Tomlin (2006); <sup>b</sup>Herbicida también protonable a bajos niveles de pH.

**Herbicidas Ácidos: Clopiralida e imazetapir** son dos herbicidas que se encuentran como aniones al pH de la mayoría de los compartimentos ambientales. Clopiralida tiene un pK<sub>a</sub> de 2.1 (grupo carboxílico) y es un herbicida de tipo auxínico, sistémico y selectivo, que pertenece a la familia de los ácidos piridino-carboxílicos. Se usa para el control de malas hierbas de hoja ancha, en pre-emergencia y post-emergencia temprana, en diferentes cultivos a dosis de 0.07-0.56 kg/ha. Imazetapir tiene un pK<sub>a1</sub>= 3.9 (grupo carboxílico) y un pK<sub>a2</sub>= 2.1 (N imidazólico) y es un herbicida del grupo de las imidazolinonas, sistémico y selectivo, que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas. Se usa en pre- y post-emergencia para el control de malas hierbas de hoja ancha y gramíneas en diferentes cultivos a dosis de 150-300 g/ha (Tomlin, 2006).

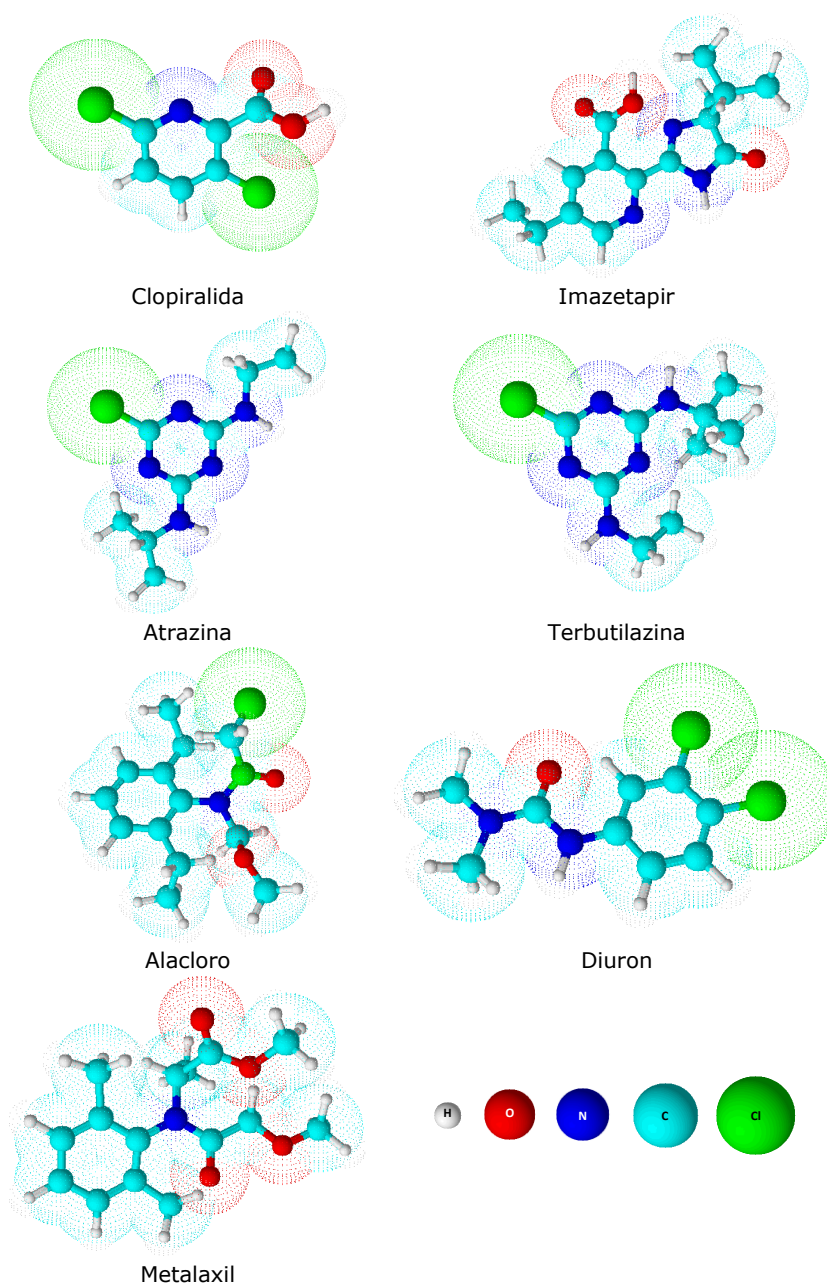


Fig. III.2. Estructura tridimensional de las moléculas de plaguicidas estudiados.

**Herbicidas Básicos:** Atrazina y terbutilazina son dos herbicidas débilmente básicos, con valores de  $pK_a$  de 1.7 (atrazina) y 1.9 (terbutilazina). Aunque al pH de la mayoría de los compartimentos ambientales se encuentran como moléculas neutras, pueden protonarse en medios ácidos o en contacto con

componentes de los suelos con una elevada acidez superficial (Laird, 1996; Celis et al., 1997b, 1998b, 2007; Cox et al., 2000a). Pertenecen a la familia de las s-triazinas y se usan en pre-emergencia y post-emergencia temprana para el control de malas hierbas de hoja ancha y gramíneas en diferentes cultivos a dosis en torno a 1 kg/ha. Son sistémicos, selectivos, bien absorbidos por las raíces y más débilmente por las hojas y actúan inhibiendo el transporte de electrones en la fotosíntesis.

**Pesticidas Neutros-polares: Alacloro, diurón y metalaxil** son plaguicidas neutros que presentan solubilidades en agua muy diferentes (Tabla III.2). Alacloro es un herbicida perteneciente al grupo de las cloroacetanilidas, sistémico y selectivo, que se usa en pre-emergencia inhibiendo la síntesis de lípidos para el control de malas hierbas de hoja ancha y gramíneas anuales a dosis de 1.5-4.5 kg/ha (Tomlin, 2006). Diurón es un herbicida del grupo de las fenilureas, sistémico y selectivo, usado en pre-emergencia para el control de malas hierbas a dosis de 0.5-5 kg/ha (Tomlin, 2006). Metalaxil es un fungicida perteneciente al grupo de la fenilacetamidas, sistémico y con acción protectora y curativa frente a diversas enfermedades de las plantas, principalmente provocadas por hongos del grupo *Oomycora*, usándose habitualmente a dosis de 0.5-1.5 kg/ha (Tomlin, 2006).

#### III.2.1.3. Suelos

En este capítulo se han utilizado dos suelos con características bien diferenciadas, que se indican en la Tabla III.3. El suelo 1 es un suelo forestal franco-arenoso de pH ácido procedente de Noruega, mientras que el suelo 2 es un suelo agrícola, franco arcillo-arenoso de pH alcalino procedente de Sevilla. Se tomaron muestras de los 20 primeros cm de la capa superficial de los suelos que se llevaron al laboratorio y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se tamizaron con un tamiz de luz de malla de 2 mm y se almacenaron en botes de plástico a 4 °C hasta su utilización.

Tabla III.3. Características de los suelos utilizados.

	Clase textural	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	C.O (%)	pH
Suelo 1	Franco arenoso	56	33	11	5.5	4.5
Suelo 2	Franco arcilloso arenoso	63	16	21	1.4	8.0

### III.2.2. MÉTODOS

#### III.2.2.1. Síntesis de los complejos montmorillonita-quitosano (SW-CH)

Los complejos montmorillonita-quitosano (SW-CH) se prepararon mediante diferentes procedimientos que se desarrollaron sobre la base del método descrito previamente por Darder et al. (2003). Se prepararon seis complejos diferentes con las condiciones que se resumen en la Tabla III.4. Para la síntesis de todos los complejos se utilizaron 0.8 g de arcilla, a los cuales se les añadió 200 ml de una disolución acuosa que contenía 650 mg de quitosano a pH 5.0. Asumiendo un grado de desacetilación del quitosano del 80%, los 650 mg de quitosano contenían aproximadamente 3 mmol de grupos  $\text{NH}_2$  protonables.

Tabla III.4. Nomenclatura y condiciones de síntesis de los complejos SW-CH.<sup>a</sup>

Nomenclatura	Arcilla (0.8 g)	Solución de Quitosano (CH) (650 mg CH + 200 ml disolución acuosa)	T (°C)	pH <sub>inicial</sub>	pH <sub>final</sub>
SW-CH-1	SWy-2	CH LMW + AcOH (30 mmol) + NaOH (30 mmol)	25	5.0	5.0
SW-CH-2	SWy-2	CH LMW + AcOH (30 mmol) + NaOH (30 mmol)	<b>60</b>	5.0	5.0
SW-CH-3	SWy-2	<b>CH MMW</b> + AcOH (30 mmol) + NaOH (30 mmol)	25	5.0	5.0
SW-CH-4	SWy-2	CH LMW + AcOH ( <b>3 mmol</b> )	25	5.0	5.0
SW-CH-5	<b>Na-SWy-2</b>	CH LMW + AcOH ( <b>3 mmol</b> )	25	5.0	5.0
SW-CH-6	SWy-2	CH LMW + <b>HCl (0.3 mmol)</b>	25	5.0	7.3

<sup>a</sup>CH LMW: Quitosano de bajo peso molecular; CH MMW: quitosano de peso molecular medio; AcOH: ácido acético. En negrita se indican las principales diferencias entre las condiciones utilizadas para la preparación de cada complejo y las condiciones utilizadas para la muestra SW-CH-1.

Para la preparación del complejo SW-CH-1 se utilizó el quitosano LMW, disolviendo 650 mg del mismo en 200 ml de una disolución acuosa que contenía 30 mmol de ácido acético. La disolución obtenida (pH= 2.8) se mantuvo en agitación durante cuatro horas, transcurridas las cuales el pH se ajustó a 5.0 mediante la adición de unas gotas de NaOH 10 M (aproximadamente 30 mmoles de NaOH). Posteriormente, se le añadió a la disolución de quitosano 0.8 g de SWy-2 y la suspensión obtenida se dejó en agitación durante 24 h a temperatura ambiente (25 °C). Transcurrido ese tiempo, la muestra se centrifugó, se lavó cinco veces con 200 ml de agua destilada y, finalmente, se liofilizó. El sólido obtenido se homogeneizó en un mortero de ágata y se guardó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Los complejos SW-CH-2 y SW-CH-3 se prepararon siguiendo la misma metodología que para el complejo SW-CH-1, exceptuando que para la síntesis de

SW-CH-2 la temperatura se aumentó hasta 60 °C y para SW-CH-3 el quitosano que se utilizó fue el de peso molecular medio ó MMW (Tabla III.4)

Las muestras SW-CH-4, SW-CH-5 y SW-CH-6 se prepararon reduciendo la cantidad de ácido utilizado para disolver el quitosano. Cuando se prepararon las muestras descritas anteriormente (SW-CH-1, SW-CH-2 y SW-CH-3), la cantidad de ácido acético utilizada para disolver el biopolímero (30 mmol) correspondía a diez veces la cantidad de grupos  $-NH_2$  protonables en 650 mg de quitosano (3 mmol) y se neutralizó el exceso de ácido con NaOH. Para las muestras SW-CH-4, SW-CH-5 y SW-CH-6, la cantidad de ácido utilizada correspondió al 100%, para las dos primeras, y sólo al 10%, para la muestra SW-CH-6, de la cantidad de grupos  $-NH_2$  presentes en los 650 mg de quitosano.

Así, las muestras SW-CH-4 y SW-CH-5 se prepararon usando 3 mmol de ácido acético para disolver el biopolímero y eran idénticas entre sí, excepto en que SW-CH-5 se preparó utilizando la montmorillonita Na-SWy-2, saturada en Na, en lugar de la montmorillonita original SWy-2 (Tabla III.4). En ambas muestras, la disolución de quitosano alcanzó un pH de 5 sin necesidad de adicionar NaOH. Después de añadirle la arcilla, se dejó en agitación durante 24 h, se centrifugó y el sólido resultante se lavó y se liofilizó.

La muestra SW-CH-6 se preparó utilizando 0.3 mmol de HCl para disolver el biopolímero y, debido a la baja cantidad de ácido utilizada, el pH obtenido en el equilibrio, tras agitar el quitosano con la arcilla, fue de 7.3, considerablemente superior al valor de pH de la disolución inicial de quitosano que era de 5.

Para poder comparar los efectos producidos por el quitosano asociado a la montmorillonita, también se sintetizaron muestras controles de montmorillonita sin quitosano sometidas a diferentes tratamientos (SW-BL) (Tabla III.5). SW-BL-1 se preparó añadiendo 0.8 g de SWy-2 a 200 ml de una disolución que contenía 30 mmol de ácido acético, ajustada a un pH de 5 mediante la adición de NaOH 10 M. SW-BL-2 se preparó a partir de 0.8 g de SWy-2 con 200 ml de una disolución con 3 mmol de ácido acético. Para SW-BL-3 se utilizó una disolución que contenía 0.3 mmol de ácido HCl sin la adición de NaOH. Las suspensiones resultantes se agitaron durante 24 h y posteriormente se centrifugaron y lavaron cinco veces con 200 ml de agua destilada, liofilizándose finalmente.

Tabla III.5. Nomenclatura y condiciones de síntesis de las muestras control (SW-BL).

Nomenclatura	Muestra correspondiente al Blanco	Arcilla (0.8 g)	Solución (200 ml disolución acuosa)	T (°C)	pH <sub>inicial</sub>	pH <sub>final</sub>
SW-BL-1	SW-CH-1, 2 y 3	SWy-2	AcOH (30 mmol) + NaOH (30 mmol)	25	5.0	5.0
SW-BL-2	SW-CH-4	SWy-2	AcOH (3 mmol)	25	3.4	3.8
SW-BL-3	SW-CH-6	SWy-2	HCl (0.3 mmol)	25	2.9	6.4

### **III.2.2.2. Caracterización de los complejos SW-CH**

Todos los complejos sintetizados (SW-CH) y las muestras control (SW-BL) se caracterizaron por análisis elemental de C y N, difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier y medidas de potencial Z.

Análisis Elemental: Los análisis elementales se realizaron utilizando un analizador Perkin-Elmer, modelo 1106, determinándose el contenido de C y N tanto de las muestras de arcilla y quitosano de partida como de los complejos y blancos sintetizados.

Difracción de Rayos X: Los difractogramas de rayos X se realizaron sobre agregados orientados, secados al aire y calentados a 200 °C. Las condiciones de operación fueron un voltaje de 40 kV, intensidad de 30 mA, velocidad de barrido 2 °/min y paso de 0.02° en unidades de 2θ y se utilizó un difractómetro Siemens D-5000 con radiación CuKα.

Microscopía Electrónica de Barrido: La morfología de los complejos sintetizados se estudió obteniendo imágenes de microscopía electrónica, utilizándose un microscopio electrónico de barrido Hitachi S5200. Las muestras en forma de polvo se recubrieron de una capa de oro para inmovilizarlas antes de visualizarlas. Se analizaron en el Centro de Investigación Tecnológica e Innovación (CITIUS) de la Universidad de Sevilla.

Espectroscopia Infrarroja: Se utilizó un espectrómetro Jasco FT / IR 6300 (Jasco Europa srl) colocando directamente las muestras sólidas en un portamuestras horizontal de reflectancia total atenuada (ATR). El barrido se realizó en el intervalo entre 400 y 4000 cm<sup>-1</sup>, utilizando un promedio de 32 registros para mejorar la relación señal:ruido. A los espectros obtenidos se les restó el de un blanco sobre la celda vacía para salvar las interferencias producidas por el CO<sub>2</sub> y vapor de agua atmosféricos.

Potencial Z: Se midió usando un equipo Zetasizer Nano ZS (Fig. III.3) del CITIUS (Universidad de Sevilla), que es un equipo de alta sensibilidad y opera con un tamaño de partícula de 5 nm a 10 μm. El potencial zeta es uno de los parámetros fundamentales que controla la interacción de las partículas en suspensión acuosa. Cuando partículas con carga se aproximan unas a otras, el que se repelan o atraigan depende del equilibrio entre las fuerzas de atracción y de repulsión experimentadas, que vienen determinadas por la magnitud del potencial en la capa más próxima a la superficie de la partícula (en la Fig. III.4, capa de deslizamiento). Este es el potencial a una corta distancia de la superficie, donde las moléculas del dispersante se mueven con respecto a las moléculas en el límite de la superficie.



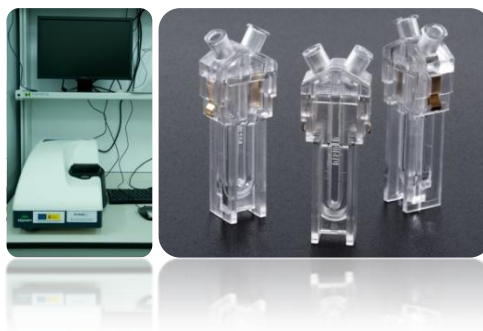


Fig. III.3. Zetasizer Nano ZS (izquierda) y celdas para la medida del potencial Z (derecha).

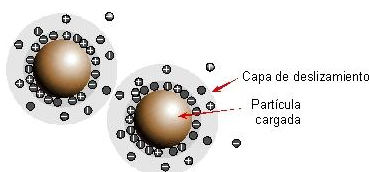


Fig. III.4. Representación de una partícula cargada.

Las medidas de potencial Z se llevaron a cabo usando suspensiones de muestra de 0.15 mg/ml preparadas bien en agua destilada bien en HCl 1 mM (pH= 3).

#### III.2.2.3. Evaluación preliminar de los complejos SW-CH como adsorbentes de plaguicidas

El estudio preliminar realizado con el fin de evaluar la capacidad adsorbente de los complejos montmorillonita-quitosano para plaguicidas con diferentes características se llevó a cabo utilizando la muestra SW-CH-4 (Tabla III.4). Dicho estudio se realizó a dos valores de pH diferentes: 1) al pH de la propia disolución del plaguicida preparada en agua ( $\text{pH} \approx 7$ ) y 2) a  $\text{pH} = 3$ , preparando la disolución inicial del plaguicida en HCl 1 mM.

Los experimentos de adsorción se realizaron utilizando tubos pyrex de vidrio con tapones de rosca, en los que se pesaron 20 mg de adsorbente (SW-CH-4) y a los que se les añadió 8 ml de una disolución de 1 mg/l de plaguicida a los distintos pH. Las muestras se agitaron durante 24 h a una temperatura ambiente de  $20 \pm 2$  °C, se centrifugaron a 5000 rpm y se midió la concentración del plaguicida en la disolución de equilibrio, bien por cromatografía líquida de

alta resolución (HPLC), bien por centelleo líquido (Fig. III.5). También se prepararon disoluciones iniciales de plaguicida sin adsorbente que sirvieron como controles para tener en cuenta posibles pérdidas del plaguicida debido a otros procesos diferentes al de adsorción a los sólidos.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución: Para las medidas por HPLC, se utilizó un cromatógrafo de la casa comercial "Waters Millipore" compuesto por un controlador del sistema Waters 600E System Controller, un detector de radiación ultravioleta emitida por lámpara de deuterio Waters 998 Photodiode Array Detector y un inyector automático de muestras Waters 717 Autosampler (Fig. III.5). Las condiciones analíticas utilizadas para los plaguicidas analizados por la técnica se resumen en la Tabla III.6. En todos los casos, se utilizó para el análisis una columna Novapack C18 de 150 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno, con un flujo de fase móvil de 1 ml/min para todos los plaguicidas, excepto para la clopiralida que fue de 0.7 ml/min, y un volumen de inyección de muestra de 25 µl. Las curvas de calibración que se utilizaron para los análisis, se obtuvieron con patrones cuya concentración variaba entre 0.01 y 2 mg/l.

Tabla III.6. Condiciones analíticas para la determinación de los plaguicidas por HPLC.

<b>Pesticidas</b>	<b>Fase Móvil<sup>a</sup></b>	<b>λ de detección (nm)</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Tiempo de análisis (min)</b>
Clopiralida	AcOH:ACN:H <sub>2</sub> O (3.5:5:91.5)	280	6.3	10
Terbutilazina	H <sub>2</sub> O:ACN (60 : 40)	220	7.9	10
Diuron	H <sub>2</sub> O:ACN (60 : 40)	250	4.5	10
Metalaxil	H <sub>2</sub> O:MeOH (50 : 50)	213	8.0	10

<sup>a</sup> AcOH: ácido acético; ACN: acetonitrilo; MeOH: metanol.

Centelleo líquido: Esta técnica se utilizó cuando teníamos disponibilidad, y era conveniente para el rango de concentraciones a medir, el empleo del plaguicida marcado con <sup>14</sup>C. Este fue el caso de los herbicidas atrazina, alacloro e imazetapir, para los que se empleó un contador de centelleo de la marca Tri-Carb modelo 1500 Packard (Fig. III.5). Para el análisis se tomó 1 ml de muestra de la disolución a cuantificar su concentración, al que se añadieron 5 ml de líquido de centelleo Ecolite (+) (MP Biomedical-ICN, Irvine, CA, USA) y el tiempo de análisis fue de 10 min. En estos casos, a la disolución inicial de plaguicida se añadió una pequeña cantidad de plaguicida marcado con <sup>14</sup>C para tener una radioactividad en torno a 5000 dpm.

Cálculo de cantidad de plaguicida adsorbido y coeficiente de distribución:  
La cantidad de plaguicida adsorbido (Cs) en estos experimentos preliminares de

adsorción se obtuvo a partir de la diferencia entre la concentración de la disolución inicial del plaguicida ( $C_{ini}$ ) y la de equilibrio ( $C_e$ ):

$$Cs = [(C_{ini} - C_e) / M] \times V$$

donde:

Cs: es la cantidad adsorbida de plaguicida (mg/kg)

$C_{ini}$ : es la concentración inicial del plaguicida (mg/l)

$C_e$ : concentración de plaguicida en la disolución de equilibrio (mg/l)

M: masa del adsorbente (kg)

V: volumen de la disolución (l)

Los porcentajes de plaguicida adsorbido, % Ads, a la concentración inicial utilizada se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Ads} = [(C_{ini} - C_e) / C_{ini}] \times 100,$$

mientras que los coeficientes de distribución  $K_d$  (l/kg) se calcularon como:

$$K_d = Cs/C_e$$



Fig. III.5. Imagen del HPLC y del contador de centelleo utilizados.

#### III.2.2.4. Estudio del herbicida clopiralida como modelo de herbicida aniónico

Tras los estudios preliminares, se decidió seleccionar el herbicida clopiralida como ejemplo de plaguicida por el que los complejos SW-CH presentaron una alta afinidad y se desarrollaron experimentos dirigidos a profundizar en el estudio del proceso de adsorción-desorción de este herbicida y a ilustrar algunas posibles aplicaciones de los complejos SW-CH como adsorbentes del mismo. A continuación se detallan los distintos experimentos realizados.

##### III.2.2.4.1. Estudios de adsorción-desorción en medio acuoso

En este apartado se describe la metodología seguida en los distintos experimentos de adsorción-desorción realizados con el herbicida clopiralida.

a) **Efecto del pH:** Se prepararon distintas disoluciones de clopiralida a una concentración inicial de 1 mg/l ( $\approx 5 \mu\text{M}$ ) a las que se ajustó el pH (2, 3, 4 y 7) por la adición de HCl. Se pesaron, por triplicado, 20 mg de complejo SW-CH-1 y se añadió 8 ml de las disoluciones de clopiralida a los distintos pH, tras lo cual las suspensiones fueron agitadas durante 24 h a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . A continuación, las suspensiones se centrifugaron y los sobrenadantes se filtraron y analizaron por HPLC para determinar la concentración de herbicida en disolución ( $C_e$ ) y calcular la cantidad adsorbida en el complejo ( $C_s$ ), ésta última tal y como se describe en el apartado anterior.

b) **Cinética de adsorción:** Se pesaron, por triplicado, 20 mg del complejo SW-CH-1, y se le adicionó una disolución de clopiralida (1 mg/l) a un pH inicial de 3.0, seleccionado como óptimo a partir del experimento descrito en el párrafo anterior. Las muestras se agitaron durante 1, 3, 6, 9, 24 y 48 h y, transcurrido el tiempo deseado, se centrifugaron los tubos y el sobrenadante se filtró con un filtro de  $0.45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro y se analizó por HPLC. De esta manera se determinó la concentración de herbicida en disolución y la cantidad adsorbida a los diferentes tiempos.

c) **Coefficiente de distribución**  $K_d$  (l/kg): Se obtuvo a una concentración de clopiralida 1 mg/l ( $\approx 5 \mu\text{M}$ ) para todos los complejos SW-CH preparados, con el fin de comparar la afinidad de cada uno de ellos por el herbicida clopiralida. Este experimento se realizó agitando, por triplicado, 20 mg de cada complejo con 8 ml de una disolución de clopiralida de 1 mg/l en las condiciones óptimas de adsorción obtenidas a partir de los experimentos sobre el efecto del pH y el tiempo de equilibrio (cinética) en la adsorción. Dichas condiciones fueron un pH inicial de 3 y un tiempo de agitación de 24 h. Los coeficientes de distribución del herbicida para cada complejo SW-CH se calcularon, tal y como se describe en el apartado III.2.2.3, según la fórmula:

$$K_d = C_s/C_e$$

d) **Isotermas de adsorción:** Se obtuvieron para el herbicida clopiralida sobre algunos complejos SW-CH seleccionados. Se pesaron 20 mg de los complejos por duplicado y se pusieron en contacto con disoluciones de clopiralida a diferentes concentraciones iniciales ( $C_{ini} = 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 100, 500$  mg/l) preparadas a pH= 3. Se agitaron durante 24 h a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C, se centrifugaron y se retiraron 4 ml de sobrenadante, que se filtraron y se analizaron por HPLC.

Las isotermas de adsorción se obtuvieron representando la concentración de herbicida adsorbido,  $C_s$ , frente a la concentración de equilibrio,  $C_e$ , y se ajustaron a la ecuación de Freundlich:

$$C_s = K_f C_e^{N_f}$$

La modelización de las isotermas se realizó a partir del ajuste matemático a la forma logarítmica de la ecuación de Freundlich:

$$\log C_s = \log K_f + N_f \log C_e$$

donde:

$C_s$ : es la cantidad de clopiralida adsorbida

$C_e$ : es la concentración de equilibrio

$K_f$  y  $N_f$  son las constantes empíricas de Freundlich.

El valor de  $K_f$ , al coincidir en valor numérico con  $C_s$  cuando  $C_e=1$  y, por tanto, con  $K_d$  a esa misma concentración de equilibrio, puede ser considerada como una medida relativa de la capacidad de adsorción, especialmente cuando  $C_e=1$  está cercano al rango de concentraciones estudiadas (Hermosín y Cornejo, 1987)

e) **Desorción:** Se midió a partir de distintas muestras SW-CH seleccionadas. Inmediatamente después de medir la adsorción a una  $C_{ini}= 2$  mg/l, se retiraron 4 ml de sobrenadante para el análisis de la adsorción y se sustituyeron por 4 ml de agua o NaCl 0.1 M. Los tubos se resuspendieron, se agitaron a  $20 \pm 2$  °C durante 24 h, se centrifugaron y se retiraron 4 ml de sobrenadante para ser filtrados y analizados por HPLC. Este proceso se repitió

un total de tres veces. Se representó la cantidad residual adsorbida, calculada a partir de las concentraciones iniciales de desorción ( $C_e/2$ ), la concentración final de la misma y la cantidad inicialmente adsorbida  $C_s$ , frente al número de orden del lavado.

#### III.2.2.4.2. Estudios de adsorción en suspensión suelo:agua

Los estudios de adsorción en suspensiones suelo:agua se realizaron para comprobar la capacidad de los complejos SW-CH de aumentar la adsorción del herbicida clopiralida una vez añadidos a suelos. Para ello, se realizaron estudios de adsorción usando los complejos SW-CH-5 y SW-CH-6, seleccionados por presentar una elevada afinidad por el herbicida, y dos suelos con diferentes características, en particular en cuanto a sus valores de pH (Tabla III.3).

Se pesaron, por triplicado, 0.5 g de las muestras de suelos, a las que se les añadió el complejo a diferentes porcentajes (0%, 5%, y 10%) y posteriormente 8 ml de una disolución acuosa de 1 mg/l de clopiralida preparada en agua ( $\text{pH} \approx 7$ ). Tras agitar durante 24 h a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , las suspensiones fueron centrifugadas y se tomaron alícuotas de 4 ml del sobrenadante, que se filtraron y posteriormente se analizaron por HPLC.

La cantidad de clopiralida adsorbida ( $C_s$ ) se determinó a partir de la diferencia entre la concentración de herbicida inicial ( $C_{\text{ini}}$ ) y la concentración de equilibrio ( $C_e$ ).

Los porcentajes de adsorción de clopiralida (% Ads) y los coeficientes de distribución ( $K_d$ ) se calcularon también como se describe anteriormente en el apartado III.2.2.3.

#### III.2.2.4.3. Evaluación de los complejos SW-CH como soportes para la preparación de formulaciones de liberación lenta del herbicida

Con aquellos complejos SW-CH que en las pruebas de adsorción-desorción presentaron mejores propiedades adsorbentes, se prepararon formulaciones de liberación lenta o controlada de clopiralida pre-adsorbiendo el herbicida en los complejos. Posteriormente, con dichos complejos bionanocomposite-clopiralida se realizaron estudios de extracción, movilidad en suelos y bioensayos. El objetivo de este apartado fue ilustrar la capacidad de los complejos montmorillonita-quitosano de actuar como soportes del herbicida para liberarlo lentamente y de esta forma reducir su movilidad en el suelo y, por tanto, aumentar su eficacia.

#### III.2.2.4.3.1. Preparación de las formulaciones

Para la preparación de las formulaciones, se pesaron 100 mg de los adsorbentes elegidos (SW-CH-4 y SW-CH-6) y se pusieron en contacto con una disolución acuosa de clopiralida de una concentración de 100 mg/l preparada en HCl 1 mM (pH 3).

La suspensión se agitó durante 3 h y, seguidamente, se filtró al vacío, dejando el sólido resultante (complejo adsorbente-herbicida) secar al aire. El líquido obtenido tras el filtrado se analizó por HPLC para saber la concentración de herbicida que quedaba en la disolución.

#### III.2.2.4.3.2. Contenido en herbicida de las formulaciones

El contenido en herbicida de las formulaciones preparadas se estimó de forma indirecta a partir de la diferencia entre la concentración inicial de la disolución de clopiralida utilizada para la preparación de la formulación (100 mg/l) y la concentración del líquido obtenido tras el filtrado de la formulación. Además, también se obtuvo a partir de un procedimiento directo, pesando 5 mg de formulación y extrayéndola con 10 ml de una solución acuosa de NaCl 0.1 M. La suspensión se agitó durante 24 h y el sobrenadante se filtró y se analizó por HPLC para así poder calcular la cantidad de herbicida extraída.

#### III.2.2.4.3.3. Experimentos de lixiviación

Los estudios de lixiviación se realizaron usando columnas de vidrio empaquetadas a mano de 30 cm de longitud y 3 cm de diámetro interno (Fig. III.6 y Fig. III.7).

En la parte inferior de las columnas se puso una pequeña cantidad de lana de vidrio y 10 g de arena de mar de grano grueso. A continuación, las columnas se rellenaron con los suelos 1 ó 2 (Tabla III.3) en fracciones de 5 cm hasta completar un total de 20 cm de altura. Se utilizaron aproximadamente 130 g del suelo 1 y 160 g del suelo 2. A la parte superior de la columna se le añadieron 10 g más de arena de mar, para evitar la formación de canales de flujo preferencial y hacer más uniforme la distribución del herbicida y del agua durante la aplicación.

Una vez empaquetadas, las columnas se saturaron con 100 ml de agua destilada, se dejaron drenar durante 24 h y se midió el volumen de agua percolada. A partir de la diferencia entre el volumen de agua adicionada y el recogido se calculó el volumen de poros de las columnas, que fue de  $70 \pm 1$  ml para el suelo 1 y  $63 \pm 1$  ml para el suelo 2.

El herbicida clopiralida se aplicó a las columnas como disolución acuosa y como complejo (SW-CH) con el plaguicida integrado. El complejo se colocó bien en la parte superior de la columna bien enterrado bajo 1 cm adicional de suelo. La dosis de clopiralida recomendada, según los usos, varía entre 0.07 y 0.56 kg/ha y para el experimento se utilizó 0.5 kg/ha.

Todos los días se les adicionaba a las columnas 15 ml de agua destilada y se recogían los lixiviados recuperados, para posteriormente filtrarlos y analizarlos por HPLC.

Una vez finalizado el experimento de lixiviación, las columnas se dividieron en 4 secciones de 5 cm, correspondiendo a las diferentes profundidades (0-5, 5-10, 10-15, 15-20 cm) de la misma. Para determinar la cantidad de herbicida retenido en los suelos, se realizó una extracción utilizando NaCl 1 M. Cada anillo de suelo se puso en agitación durante 24 h con 100 ml del extractante. Las muestras se centrifugaron, se tomaron alícuotas de los distintos extractos, se filtraron y posteriormente se analizaron por HPLC. El estudio de lixiviación se realizó por triplicado.

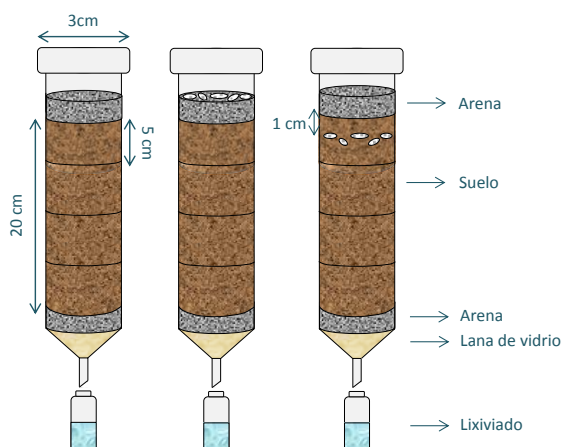


Fig. III.6. Esquema de las columnas de suelo.





Fig. III.7. Fotografía de las columnas durante el experimento de lixiviación.

#### III.2.2.4.3.4. Bioensayos

**a) Bioensayo general:** Se prepararon macetas de plástico de 50 cm<sup>2</sup> de superficie, colocando en la parte inferior lana de vidrio para tapar los agujeros de desagüe y evitar pérdidas de suelo. Posteriormente, se colocaron 30 g de arena de mar y se adicionó 200 g de suelo 2 (Fig. III.8).

Tras saturar las macetas con agua y dejar drenar durante 24 h, se sembraron 20 semillas de *Lactuca sativa* e inmediatamente después se aplicó el herbicida a una dosis de 0.5 kg/ha, bien como disolución acuosa, bien en forma de complejo SW-CH-6-Clopivalida. Para poder comparar la eficacia de los complejos se sembraron macetas sin tratamiento alguno. El ensayo se realizó por duplicado distribuyendo las macetas al azar en un lugar apropiado para la germinación de las semillas. Transcurridas dos semanas, se cortó y pesó la masa herbácea, para poder valorar la bioeficacia del herbicida en sus distintas formas de aplicación.



Fig. III.8. Fotografía de las macetas utilizadas en los bioensayos con clopiralida.

**b) Bioensayo con simulación de alto riesgo de lixiviación:** El experimento descrito en este apartado se diseñó para comprobar la capacidad que poseía el complejo SW-CH-6-Clopivalida de reducir la lixiviación del herbicida tras un período de precipitaciones abundantes y su repercusión en la eficacia biológica del herbicida. Para ello, tras la aplicación del herbicida a las macetas, se aportó una cantidad de agua equivalente a 40 l/m<sup>2</sup>.

Tal y como se describe en el apartado anterior, se montaron macetas de 50 cm<sup>2</sup> colocando lana de vidrio en la parte inferior, 30 g de arena de mar y 200 g de suelo 2.

A continuación, se aplicó el herbicida clopiralida a una dosis de 0.5 kg/ha, bien como disolución acuosa (libre), bien como complejo SW-CH-6-Clopivalida. Inmediatamente después de aplicar el herbicida, se añadieron 200 ml de agua, simulando una lluvia intensa de 40 l/m<sup>2</sup>. Los lixiviados se recogieron y se analizaron por HPLC. Se sembraron 20 semillas de *Lactuca sativa* y, transcurridas dos semanas, se cortó y pesó la masa herbácea para poder valorar la bioeficacia del herbicida que quedó en las macetas tras el aporte de los 200 ml de agua.

### III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.3.1. Caracterización de los sistemas montmorillonita-quitosano

##### III.3.1.1. Análisis elemental

La Tabla III.7 muestra los resultados del análisis elemental (C, N) de los diferentes complejos montmorillonita-quitosano sintetizados. A partir del % N se calculó la cantidad de biopolímero presente en cada una de las muestras. Como refleja la Tabla III.7, la cantidad de quitosano encontrado varió entre el 6.4% para la muestra SW-CH-3 y el 43.6% de la muestra SW-CH-6.

Tabla III.7. Resultado de los análisis elementales de los complejos SW-CH.

Nomenclatura	C (%)	N (%)	Quitosano (%)	Arcilla (%)	Quitosano (cmol/kg arcilla)	Grado de Saturación <sup>a</sup> (%)
SW-CH-1	3.5	0.58	7.0	93.0	36	47
SW-CH-2	3.6	0.60	7.3	92.7	37	48
SW-CH-3	3.3	0.53	6.4	93.6	32	42
SW-CH-4	5.2	0.90	10.9	89.1	58	76
SW-CH-5	7.0	1.20	14.6	85.4	81	106
SW-CH-6	20.1	3.60	43.6	56.4	365	478

<sup>a</sup> Grado de saturación de la CIC de la arcilla por el quitosano.

Si asumimos que el grado de desacetilación del quitosano es del 80% y que todos los grupos  $-NH_2$  están protonados, la cantidad de quitosano presente en las muestras representó entre el 42 y el 478% de la capacidad de intercambio catiónico de la arcilla (Tabla III.7). El análisis elemental reveló que para todas las muestras de montmorillonita sometidas a los tratamientos control o blancos (SW-BL-1, SW-BL-2, SW-BL-3) el contenido de C era  $< 0.3\%$  y el contenido en N era  $< 0.05\%$ .

Uno de los factores que más afectó a la cantidad de quitosano presente en los complejos fue el pH de equilibrio de la suspensión montmorillonita-quitosano (Tablas III.4 y III.7). Cuando el pH de dicha suspensión estuvo por debajo del  $pK_a$  del quitosano ( $pK_a = 6.3$ ), la cantidad de quitosano en las muestras rara vez superó la CIC de la arcilla, como ocurre desde la muestra SW-CH-1 a la SW-CH-5. De hecho, para estas muestras, aunque inicialmente se añadió quitosano en una cantidad correspondiente al 500% de la CIC de la arcilla, la cantidad final de quitosano en los complejos resultantes estuvo generalmente muy por debajo de la CIC de la arcilla (Tabla III.7).

Por el contrario, cuando el pH de la suspensión en equilibrio estuvo por encima del  $pK_a$  del quitosano, como ocurre para la muestra SW-CH-6 (Tabla III.4), la cantidad de quitosano presente en el complejo resultante excedió en gran medida la CIC de la arcilla (Tabla III.7). Estos resultados están de acuerdo con lo observado por An y Dultz (2007a), donde el pH resultó ser un factor decisivo en la interacción del quitosano con la montmorillonita, ya que un aumento del pH conduce a una disminución del grado de protonación del biopolímero, aumentando la cantidad adsorbida sobre la arcilla.

Tomando la muestra SW-CH-1 como referencia, un aumento en la temperatura (SW-CH-2) y en el peso molecular del CH (SW-CH-3), tuvieron ambos un efecto muy pequeño en la cantidad final de quitosano en la muestra (Tabla III.7). Sin embargo, cuando se redujo la cantidad de ácido acético utilizada para disolver el biopolímero, de 30 mmol para la SW-CH-1 a 3 mmol para la muestra SW-CH-4, se produjo un aumento significativo de la cantidad de quitosano en la muestra, y este efecto fue aún más pronunciado cuando la montmorillonita fue previamente saturada en sodio (SW-CH-5). Dado que el pH de las suspensiones en equilibrio fue de 5.0 en todas estas muestras (Tabla III.4), creemos que la alta cantidad de NaOH utilizada para neutralizar la disolución en las muestras SW-CH-1, SW-CH-2, y SW-CH-3 (Tabla III.4) pudo haber dado lugar a fenómenos de competencia entre el quitosano catiónico (3 mmol) y el  $Na^+$  añadido (30 mmol), ambos en la disolución, por los sitios de intercambio catiónico de la arcilla, reduciendo así la cantidad de quitosano adsorbido.

La ausencia de hidróxido de sodio en la disolución de quitosano durante la preparación de las muestras SW-CH-4 y SW-CH-5 favoreció la reacción de intercambio del catión polimérico. La muestra saturada en sodio (SW-CH-5) presentó una mayor cantidad de quitosano, debido a que el  $Na^+$  de la arcilla homioónica Na-SWy-2 es más fácil de remplazar que la mezcla de cationes ( $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ ) presentes en la muestra de montmorillonita SWy-2 original (Theng et al., 1967; Hermosín y Pérez Rodríguez, 1981).

La muestra SW-CH-6 presentó una cantidad de quitosano muy por encima de la CIC del mineral de la arcilla (Tabla III.7). Como se describió anteriormente, esta muestra fue preparada con una disolución de quitosano disuelto con 0.3 mmol de HCl, lo que correspondía a sólo el 10% de los grupos protonables  $-NH_2$  (Tabla III.4). Debido a la baja cantidad de ácido añadido, el pH de la suspensión montmorillonita-quitosano aumentó hasta 7.3 después de agitar durante 24 h (Tabla III.4). Si tenemos en cuenta que el  $pK_a$  de los grupos aminos primarios del quitosano es de 6.3, a  $pH = 7.3$  cabe esperar que sólo un 10% de dichos grupos estuvieran en su forma protonada, lo que explica la alta cantidad de quitosano asociado con la arcilla (An y Dultz, 2007a).

### III.3.1.2. Difracción de rayos X

En la Fig. III.9a y b se muestran los diagramas de difracción de rayos X de los complejos SW-CH, las montmorillonitas (SWy-2 y Na-SWy-2) y los blancos de los complejos (SW-BL) secados al aire, mientras que en la Fig. III.9c y d se representan los difractogramas de las mismas muestras calentadas a 200°C.

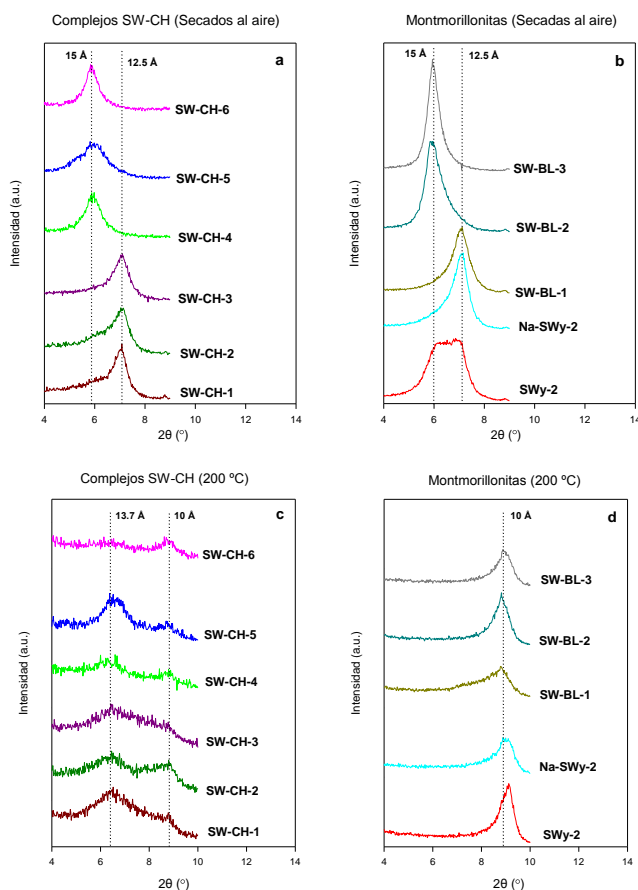


Fig. III.9. Difractogramas de rayos X de agregados orientados secados al aire de los complejos SW-CH (a) y de sus respectivos controles (b). Difractogramas de las mismas muestras calentadas a 200 °C: complejos SW-CH (c) y sus respectivos controles (d).

El difractograma de rayos X de Na-SWy-2 reflejó un espaciado basal ( $d_{001}$ ) de 12.5 Å, que es un valor congruente con el de una montmorillonita saturada en  $\text{Na}^+$  en la que el  $\text{Na}^+$  retiene una capa de moléculas de agua de hidratación en la interlámina de la arcilla (Moore y Reynolds, 1997; Nam et al.,

2009; Johnston, 2010). La muestra de SWy-2 original presentó una difracción basal mal definida entre 12 y 15 Å, probablemente como consecuencia de la presencia de distintos cationes intercambiables en la interlámina (principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) con diferentes grados de hidratación (Fig. III.9b).

El control SW-BL-1 dio una difracción basal de 12.5 Å, algo más bien definida que en la original (SWy-2) y prácticamente igual que la de Na-SWy-2. Esta muestra, como se describe en el apartado III.2.2.1, se trató con ácido acético ajustando posteriormente el pH con altas concentraciones de NaOH. Este tratamiento provoca la saturación en  $\text{Na}^+$  en gran parte de las posiciones de cambio del mineral de la arcilla, lo que explicaría el espaciado basal de 12.5 Å, similar al de Na-SWy-2. En cambio, para las muestras control tratadas con cantidades menores de ácido, y que no fueron tratadas con NaOH (SW-BL-2 y SW-BL-3), el espaciado basal obtenido fue de 15 Å. El tratamiento con la disolución de ácido acético aumenta y homogeneiza el grado de hidratación de los cationes interlaminares, de forma que todas las láminas parecen estar a la misma distancia a pesar de seguir probablemente coexistiendo  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  como cationes interlaminares.

Para los complejos SW-CH con mayores cantidades de quitosano (SW-CH-4, SW-CH-5 y SW-CH-6), la difracción basal a temperatura ambiente fue de aproximadamente 15 Å (Fig. III.9a). Este valor coincide con el obtenido por otros autores para muestras similares (Darder et al., 2003; Bleiman y Mishael, 2010; Kittinaovarat et al., 2010) y está de acuerdo con la presencia de una monocapa de quitosano intercalado en el espacio interlaminar de la montmorillonita. No obstante, para algunos complejos, como el SW-CH-5, la difracción basal muestra una cierta asimetría a ángulos bajos de  $2\theta$  (Fig. III.9a), lo que podría indicar la disposición en bicapa del polímero orgánico en algunas láminas del complejo (Darder et al., 2003). Es de destacar la diferencia apreciable con las correspondientes muestras blancos, que no sólo revelan diferencia en la distancia interlaminar, sino un mayor desorden en el empaquetamiento de las láminas, especialmente las correspondientes a los mayores contenidos de quitosano, que indican una interestratificación desordenada de láminas a distintas distancias.

En los complejos SW-CH-1, SW-CH-2 y SW-CH-3, la difracción basal estuvo centrada en torno a 12.5 Å, aunque los picos también presentaron una cierta asimetría hacia ángulos bajos de  $2\theta$  (Fig. III.9a). Probablemente, el tratamiento con NaOH llevado a cabo durante la preparación de estos complejos provocó que algunos sitios de cambio del espacio interlaminar permanecieran o fueran ocupados por  $\text{Na}^+$ , y que las reflexiones correspondientes a las láminas de arcilla intercambiadas con quitosano quedaran parcialmente oscurecidas por el aumento de la homogeneización de las reflexiones de las láminas sin intercambiar (Fig. III.9a), como lo demuestra el cambio observado en el blanco correspondiente, SW-BL-1, con respecto a la muestra original (Fig. III.9b).

Tras el calentamiento de los agregados orientados a 200 °C, todas las muestras de montmorillonita sin quitosano colapsaron a un valor de  $d_{001}$  de 9.6 - 10 Å (Fig. III.9d), debido a la pérdida del agua de hidratación de los diferentes cationes inorgánicos, quedando las láminas prácticamente a la misma distancia en todas ellas y cuyo valor muestra una deshidratación casi completa. En cambio, los complejos SW-CH (Fig. III.9c) presentaron resistencia a colapsar, mostrando una difracción basal centrada en torno a 13.7 Å. Dicho valor corresponde a una distancia de aproximadamente 4 Å entre las láminas de montmorillonita, lo que concuerda con la presencia de una monocapa de quitosano en la interlámina y, por tanto, evidencia la presencia de este polímero orgánico en el espacio interlaminar de la montmorillonita. La difracción residual cercana a los 10 Å que se identifica en la mayoría de los complejos SW-CH podría indicar la presencia de algunas láminas de arcilla no intercambiadas, ocupadas exclusivamente por cationes inorgánicos, y/o impurezas de illita que acompañan a la muestra SWy-2. Tras el calentamiento de las muestras a 200 °C, la difracción a 13.7 Å de los complejos SW-CH se encuentra, en general, mal definida, indicando sistemas poco ordenados o la intercalación parcial del biopolímero. Este efecto fue muy pronunciado en el caso del complejo SW-CH-6, cuyo elevado contenido en quitosano (Tabla III.9) pudo hacer que una importante cantidad de biopolímero permaneciese en la superficie externa de la arcilla, dando una estructura desordenada tras el calentamiento de la muestra, reflejada por una mala definición de la difracción a 13.7 Å. Incluso parte de esta difracción a 13.7 Å podría ser debida a láminas con catión inorgánico interlaminar que conserven parte de su agua de hidratación porque el biopolímero que las envuelve les impide salir. Por el contrario, la mejor definición de esta difracción se obtiene en el caso de SW-CH-5, donde la saturación en  $\text{Na}^+$  facilitó el cambio por el quitosano en la interlámina de una forma más homogénea.

#### **III.3.1.3. Microscopía electrónica de barrido**

El análisis de los complejos SW-CH por microscopía electrónica de barrido (SEM) se realizó para profundizar en la comprensión de la morfología de las muestras. Las imágenes obtenidas mostraron que la presencia de quitosano formaba estructuras laminares donde parecía que las partículas laminares de la montmorillonita quedaban como embebidas o envueltas en el biopolímero (Fig. III.10), de una forma de menos a más integradas al aumentar el contenido en quitosano. La morfología final dependió de la cantidad de quitosano en el complejo, de modo que a medida que el contenido de éste aumentó al pasar del complejo SW-CH-1 al SW-CH-6, las estructuras laminares mostraron mayor definición y tamaño.

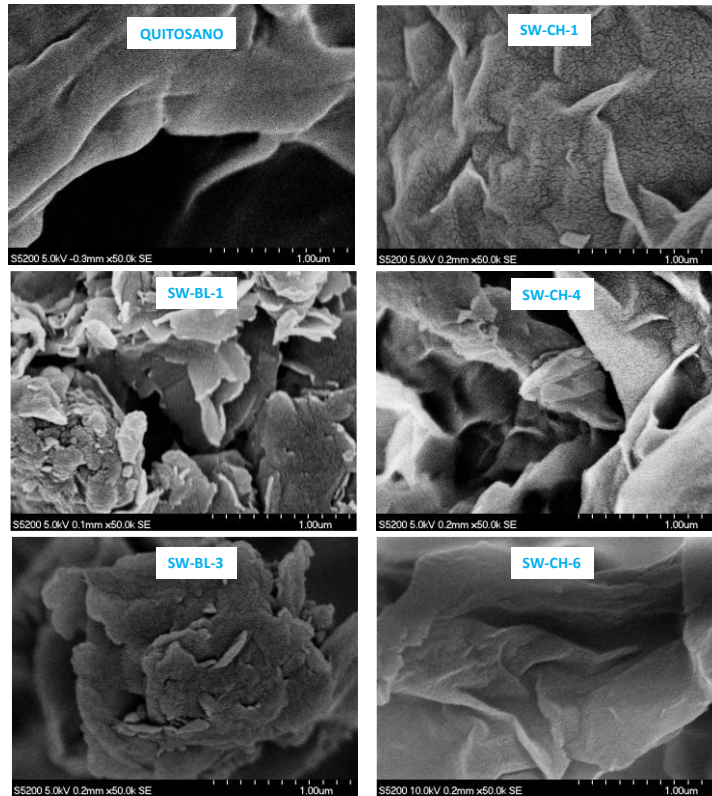


Fig. III.10. Fotografías tomadas por microscopía electrónica de barrido del quitosano y algunos de los complejos (SW-CH) y blancos (SW-BL) preparados.

Si comparamos los complejos SW-CH con sus correspondientes blancos vemos que en SW-CH-1 (SW-BL-1) las partículas de arcilla aparecen mezcladas y embebidas pero no integradas, en la estructura del quitosano. Esto sugiere que una parte del quitosano asociado a la esmectita se ha adsorbido sobre la superficie externa sin formar parte del complejo de intercambio catiónico interlamilar, resultando como una mezcla homogénea de dos compuestos diferentes, arcilla y quitosano, pero bien mezclados. En cambio, el complejo SW-CH-4 mostró una estructura más abierta, con respecto al complejo SW-CH-1, con los paquetes de láminas de arcilla más similares a las del blanco pero aumentadas en tamaño por la acción del quitosano e integradas en un solo cuerpo de láminas. Ello sugiere que el quitosano se ha adsorbido interaccionando “íntimamente” tanto con las superficies internas como externas de la SWy-2. En el complejo SW-CH-6, la acumulación de quitosano en la superficie externa de la SWy-2 formó láminas de gran tamaño, igualmente integradas como un único compuesto, dando una morfología similar a la del quitosano puro, pero en la que es posible distinguir los paquetes de láminas agregados y embebidos pero formando un cuerpo único (Fig. III.10).



**III.3.1.4. Espectroscopia de infrarrojos**

En la Fig. III.11 se representan los espectros de infrarrojos del quitosano (LMW), de la montmorillonita SWy-2 y de los complejos SW-CH con mayores contenidos en quitosano (SW-CH-4, SW-CH-5, y SW-CH-6). La asignación de las bandas se llevó a cabo de acuerdo con Madejová y Komadel (2001) para la arcilla y con Bellamy (1975) para el quitosano.

En el espectro de FT-IR del quitosano puro se identificaron las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos O-H y N-H del biopolímero, próximas a  $3300\text{ cm}^{-1}$ , las correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos C-H, cercanas a  $2900\text{ cm}^{-1}$ , y las de tensión del grupo C=O (amida I) y de deformación del grupo N-H, a  $1650\text{ cm}^{-1}$  y  $1590\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Además, las bandas cercanas a  $1400\text{ cm}^{-1}$  se pueden atribuir a las vibraciones de deformación de los grupos alifáticos C-H.

En el espectro de la montmorillonita SWy-2, las bandas características de vibraciones de tensión de los grupos hidroxilos aparecen próximas  $3630\text{ cm}^{-1}$ , las vibraciones del agua de hidratación  $\nu_{\text{OH}}$  a  $3400\text{ cm}^{-1}$  y  $\delta_{\text{OH}}$  a  $1635\text{ cm}^{-1}$ , y cerca de  $1000\text{ cm}^{-1}$  se identificaron las vibraciones de los grupos Si-O estructurales.

Los espectros de los complejos SW-CH muestran una combinación de las bandas características tanto del quitosano como de la montmorillonita SWy-2 (Fig. III.11). Una de las características más relevantes es que se aprecia un cambio en la posición de la banda de vibración de deformación de los grupos N-H del biopolímero, ya que aparece a  $1590\text{ cm}^{-1}$  en la muestra de quitosano puro, pero se desplaza a  $1530\text{ cm}^{-1}$  para los complejos SW-CH-4 y SW-CH-5. Esto indica que hay una interacción entre las cargas negativas de la superficie de la montmorillonita con los grupos aminos protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ) del quitosano (Darder et al., 2003; Monvisade y Siriphannon, 2009) haciendo que la frecuencia de deformación sea más baja.

Curiosamente, este efecto fue mucho menos evidente para la muestra SW-CH-6, para la que según los resultados de XRD y de SEM, el quitosano parece acumularse en la superficie externa de la arcilla. En esta muestra sólo una pequeña fracción de los grupos  $-\text{NH}_2$  del quitosano se encuentran en forma protonada, lo cual reduce la intensidad de las bandas correspondientes a los grupos  $-\text{NH}_3^+$  que se encuentran interaccionando con la arcilla. Además, en el complejo SW-CH-6 las intensidades de las bandas a  $3400$  y  $1635\text{ cm}^{-1}$  indican un contenido de agua relativamente alto, lo que sugiere la sustitución incompleta de los cationes inorgánicos originales de la arcilla y su agua de hidratación por las cadenas de quitosano y la posible acumulación de varias capas de quitosano en la superficie externa, confirmando lo visto por SEM. La gran intensidad y anchura de la banda a  $3400\text{ cm}^{-1}$  de SW-CH-6 incluye también diversos entornos de los grupos amino del quitosano, abundando pues en su acumulación

“externa” observada por SEM. En los complejos SW-CH-4 y SW-CH-5, las bandas correspondientes a la vibración de deformación de los grupos C-H del quitosano, próximas a  $1376\text{ cm}^{-1}$ , se desplazan también en la muestra donde el biopolímero interacciona con las láminas de la arcilla (Fig. III.11), por la constricción de espacio o impedimento estérico que supone el propio espacio interlaminar.

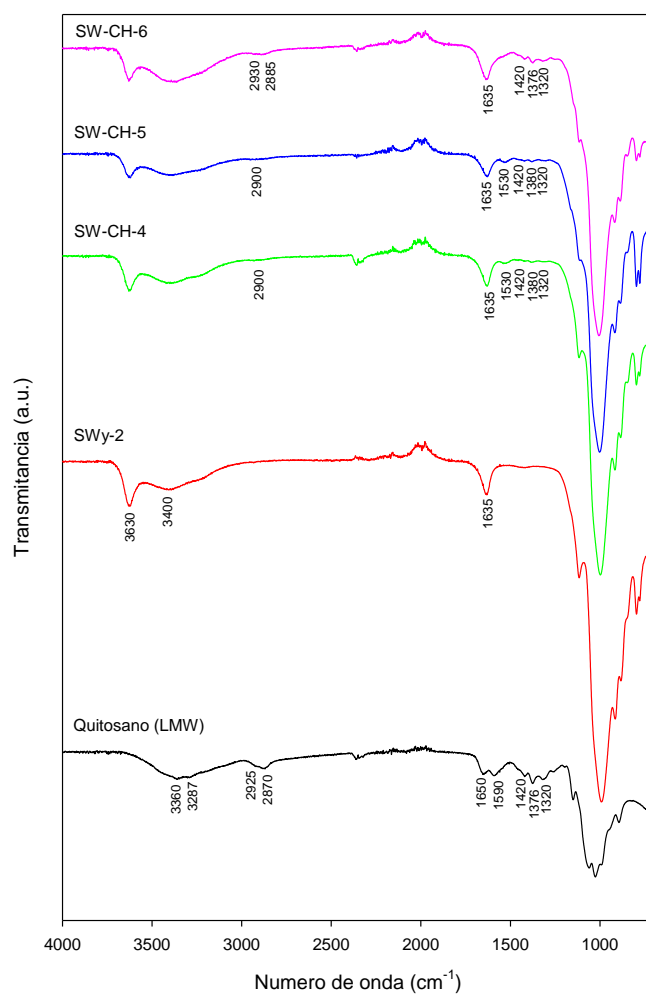


Fig. III.11. Espectros de infrarrojos de Qitosano LMW, SWy-2 y de los complejos SW-CH con mayor contenido en biopolímero.

### III.3.1.5. Medidas de potencial Z

En la Fig. III.12 está representada la gráfica de distribución de potencial Z de la montmorillonita SWy-2, obtenida usando una suspensión de arcilla al 0.15% preparada en agua (pH 7) y en HCl 1 mM (pH 3). Los análisis se realizaron por duplicado (líneas azul y rojo en la figura). A ambos valores de pH, la montmorillonita presenta un potencial Z negativo, más acusado al aumentar el pH, que se corresponde con lo esperado teniendo en cuenta la prevalencia de cargas negativas permanentes que presentan las partículas de montmorillonita. La disminución de carga negativa a pH 3 se debe a la protonación de algunos silanoles o aluminos de los bordes de las láminas, que compensa la carga negativa permanente de las láminas, aunque en una pequeña proporción.

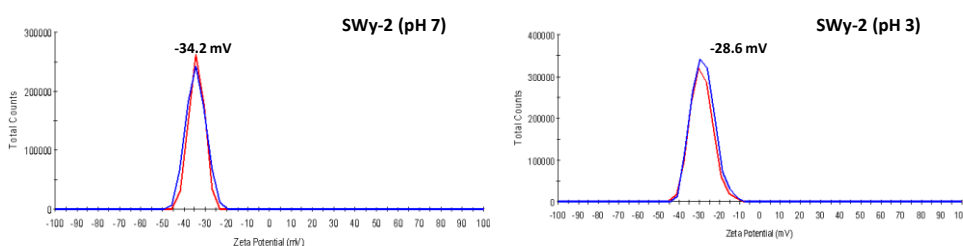


Fig. III.12. Distribución de potencial Z de la montmorillonita SWy-2 a distintos pH.

En la Fig. III.13 se muestran las gráficas de distribución de potencial Z de los complejos SW-CH-1, SW-CH-4 y SW-CH-6, tanto en suspensión acuosa (izquierda) como en HCl 1 mM (derecha). Igualmente en color azul y rojo se muestran las dos repeticiones realizadas. En suspensión acuosa, el potencial Z de todos los complejos muestra valores negativos, pero siempre menos negativos que los de la arcilla sin tratar, lo que indica que el quitosano ya está compensado parte de las cargas de las láminas externas de los “paquetes” de partículas. En medio ácido, en cambio, el potencial Z se va desplazando hacia valores de negativos a positivos, en mayor medida conforme va aumentando la cantidad de quitosano en los complejos. Este cambio refleja las características de carga del polímero orgánico, para el que la protonación de los grupos aminos a valores de pH por debajo del  $pK_a$  de los mismos (6.3) aumenta la carga positiva en el polímero y, por consiguiente, en el complejo SW-CH.

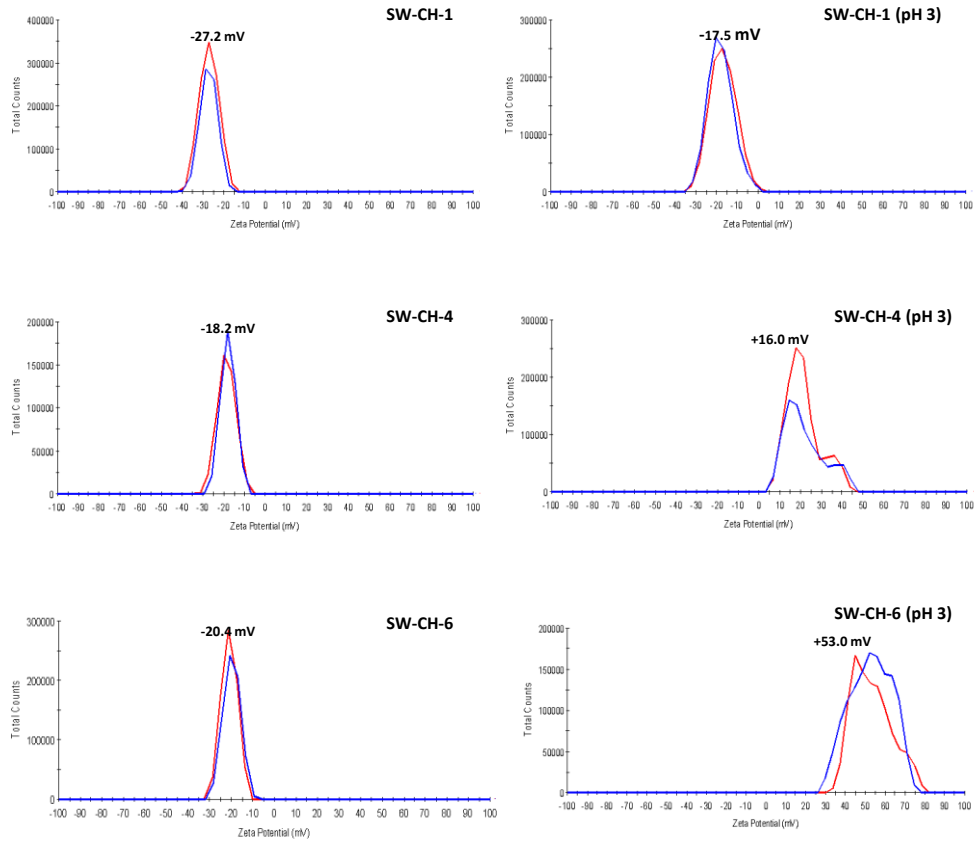


Fig. III.13. Distribución de potencial Z de los complejos SW-CH a distintos pH (7 y 3).

Es relevante señalar que así como a pH 7 los complejos muestran, al igual que la arcilla original, un único máximo de potencial Z bien definido que se mantiene a pH 3 para el complejo de menor contenido en quitosano (SW-CH-1), los complejos con mayor contenido en biopolímero (SW-CH-4 y SW-CH-6) muestran a pH 3 un rango de diversidad de máximos de potencial Z, centrado en dos para el SW-CH-4 y casi 3 puntos para el SW-CH-6. Esta diversidad de máximos de potencial Z, siempre positivos, de los complejos SW-CH-4 y SW-CH-6 puede tener su origen en la diferente distribución interlaminar y externa del polímero cargado y la posible repulsión-delaminación de los diversos paquetes laminares o interestratificados. La presencia de agua en algunas láminas, sugeridas tanto por IR como tras el calentamiento por XRD en el caso de SW-CH-6, parece tener congruencia con este comportamiento observado en el potencial Z. Además, el alto valor de potencial Z obtenido en el caso de SW-CH-6 indica también que en este caso existe una gran parte de grupos  $-NH_2$  protonados y, por tanto, que el quitosano se encuentra en una gran parte en la superficie externa de este complejo.

### III.3.2. Evaluación preliminar de los complejos SW-CH como adsorbentes de plaguicidas

En la Fig. III.14 y en las Tablas III.8 y III.9 se resumen los resultados de adsorción de diferentes plaguicidas al complejo SW-CH-4 a una concentración inicial de los plaguicidas de 1 mg/l y a dos valores de pH inicial diferentes, comparando con los resultados obtenidos para la arcilla SWy-2 original sin quitosano. La Fig. III.14 muestra los porcentajes de plaguicida adsorbido a SWy-2 y SW-CH-4 a los dos valores de pH, mientras que en las Tablas III.8 y III.9 se detallan los valores de pH en el equilibrio y los coeficientes de adsorción expresados como  $K_d$  para cada caso. Los experimentos a pH= 3 se realizaron con plaguicidas seleccionados: clopiralida, atrazina, alacloro y metalaxil.

**Adsorción a pH 7:** A un pH inicial cercano a 7, el complejo SW-CH-4 adsorbió un mayor porcentaje de casi todos los plaguicidas que la arcilla sin tratar (Fig. III.14), lo que indica un efecto positivo del quitosano en la adsorción. Una excepción a este comportamiento es la atrazina cuya adsorción por SW-CH-4 es algo menor que en la arcilla original. Los porcentajes de adsorción oscilaron entre un 2% y un 37% para la arcilla SWy-2 y entre un 4% y un 72% para el complejo SW-CH-4.

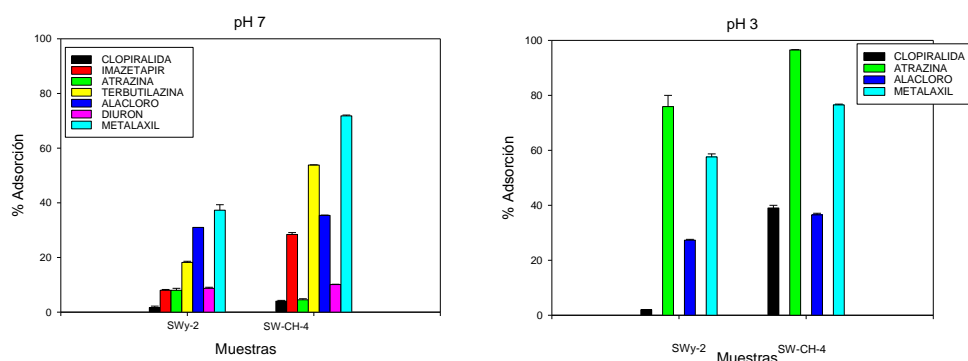


Fig. III.14. Porcentajes de adsorción de distintos plaguicidas sobre las muestras SWy-2 y SW-CH-4 a pH 7.

La diferente adsorción relativa de los diversos plaguicidas tanto a SWy-2 como a SW-CH-4 puede ser interpretada de acuerdo con su estructura molecular y carácter químico (Tabla III.2 y Fig. III.2) y sobre la base de los mecanismos de interacción conocidos entre las arcillas u organoarcillas y los compuestos orgánicos o plaguicidas (Weber y Weed, 1968; Mortland, 1970; Cornejo et al., 2008) de la forma siguiente:

- a) Los herbicidas ácidos, clopiralida e imazetapir, se adsorben muy poco en la arcilla SWy-2 porque a este pH la mayor parte de las moléculas del ácido se hallan disociadas y la coincidencia de cargas negativas entre la forma aniónica y las láminas de arcilla produce repulsión. No obstante, la pequeña adsorción observada se debe a la existencia de ciertas moléculas neutras que pueden asociarse al agua de hidratación de los cationes interlaminares y/o a la superficie hidrófoba que existe entre los puntos con sustituciones isomórficas de la arcilla, que es de baja carga laminar (Laird, 1996; Celis et al., 1997b). En el caso del complejo SW-CH-4, la asociación del quitosano baja la carga negativa de las partículas de arcilla, lo que hace que aumente la adsorción de los ácidos en forma molecular, por la propia atracción hidrófoba de las cadenas poliméricas junto con la atracción de algunos grupos  $\text{-NH}_3^+$  protonados externos o interlaminares del quitosano y los grupos carboxilatos del herbicida (Hermosín y Cornejo, 1992).
- b) Los herbicidas básicos o protonables, atrazina y terbutilazina, se adsorben a la SWy-2 asociados a los H polarizados del agua de hidratación de los cationes en el espacio interlaminar, como moléculas neutras polares y pudiendo incluso ser protonadas (Feldkamp y White, 1979, Celis et al., 1997b). En el caso de SW-CH-4, esta interacción aumenta para la terbutilazina por la interacción hidrófoba del anillo triazínico con las cadenas poliméricas, por un lado, y por la protonación compartida de los grupos NH de la triazina y del quitosano, mientras que este efecto no se observa para la atrazina. El gran aumento experimentado por la terbutilazina con respecto a la atrazina parece indicar, dada la baja solubilidad de la primera, el gran peso del primer tipo de interacción en su adsorción a la muestra SW-CH-4.
- c) Los plaguicidas neutros, alacloro, diurón y metalaxil, son compuestos que contienen grupos funcionales polares (carbonilos, etoxi y/o aminos o imídicos) que interaccionan con el agua de hidratación de los cationes interlaminares de la SWy-2, junto a partes completamente hidrófobas que interaccionan con las regiones hidrófobas de las superficies de las interláminas de SWy-2. Dado que el primer mecanismo es imprescindible para que se produzca el segundo, esta interacción se favorece con la solubilidad, de ahí la relación directa entre la cantidad adsorbida a SWy-2 y la solubilidad del plaguicida (Tabla III.8). En el caso del bionanocomposite SW-CH-4, se produjo un aumento en la adsorción de todos los plaguicidas. En este caso la interacción hidrófoba debe ocurrir con las cadenas del polímero, mientras que los enlaces polares deben ser, principalmente, puentes de hidrógeno entre los grupos  $\text{-NH}_2$  del quitosano y los oxígenos de los plaguicidas. El mayor aumento experimentado en el caso del metalaxil sugiere la prevalencia de este último mecanismo, dado que este fungicida tiene más grupos oxigenados.

Es de destacar que durante el proceso de adsorción se midieron los cambios de pH que se recogen en la Tabla III.8 y que ponen de manifiesto que, para todos los plaguicidas, el pH final de las suspensiones del complejo SW-CH-4 fue inferior al de la arcilla SWy-2. No se puede descartar que esta disminución del pH del medio haya podido contribuir a parte del incremento en la adsorción observado en el complejo SW-CH-4 respecto a la muestra SWy-2. Muchos plaguicidas muestran una mayor adsorción a montmorillonita al disminuir el pH debido a que un aumento de la acidez superficial favorece la protonación del plaguicida, lo que da lugar a una disminución de la repulsiones con la superficie de la arcilla, en el caso de plaguicidas ácidos, o a un aumento de las fuerzas de atracción, en el caso de los plaguicidas básicos (Celis et al., 1997b, 1999b; Cox et al., 2000a).

Tabla III.8. Valores de pH en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de distintos plaguicidas a SWy-2 y SW-CH-4 a una concentración inicial de 1 mg/l y un pH inicial de 7.

Pesticidas	SWy-2		SW-CH-4	
	pH <sub>final</sub>	Kd(l/kg)	pH <sub>final</sub>	Kd (l/kg)
Clopiralida	7.3	< 5	5.8	16 ± 1
Imazetapir	6.7	35 ± 1	5.4	163 ± 2
Atrazina	7.1	19 ± 2	5.8	32 ± 1
Terbutilazina	7.4	89 ± 2	5.9	466 ± 2
Alacloro	5.8	182 ± 2	6.2	219 ± 1
Diuron	7.0	38 ± 2	5.6	45 ± 1
Metalaxil	7.2	239 ± 20	6.1	1020 ± 16

Adsorción a pH 3: Para dilucidar si el aumento de la adsorción observado anteriormente en los complejos SW-CH pudiera ser debido, en parte, a la propia bajada del pH que estos confieren a la disolución, se midió para algunos plaguicidas la adsorción a un pH inicial de 3 y los resultados se muestran en la Fig. III.14 y en la Tabla III.9. Si nos fijamos en el coeficiente de distribución, Kd, como un indicador de la capacidad adsorbente (Tabla III.9), al disminuir el pH de la disolución inicial del plaguicida hasta un valor de 3, el valor de Kd para la arcilla SWy-2 sin tratar sólo aumentó en el caso de la atrazina y el metalaxil, casos en los que el plaguicida es protonable (atrazina) o muy polar (metalaxil). Por tanto, la mayor adsorción en este caso puede ser en parte debido a la bajada de pH por posible protonación de los nitrógenos protonables de estas moléculas. En el caso del bionanocomposite SW-CH-4, en cambio, aumentan todos los Kd respecto a los medidos a pH inicial de 7, incluido el del herbicida aniónico clopiralida (Tablas III.8 y III.9). En este caso puede existir una cierta

contribución de los grupos  $-NH_2$  del quitosano, en su mayor parte protonados a este pH.

Tabla III.9. Valores de pH en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de distintos plaguicidas a SWy-2 y SW-CH-4 a una concentración inicial de 1 mg/l y un pH inicial de 3.

Pesticidas	SWy-2		SW-CH-4	
	pH <sub>final</sub>	Kd	pH <sub>final</sub>	Kd (l/kg)
Clopiralida	3.4	< 5	3.7	252 ± 14
Imazetapir	-	-	-	-
Atrazina	4.5	1367 ± 316	3.6	10970 ± 384
Terbutilazina	-	-	-	-
Alacloro	6.1	150 ± 6	4.6	230 ± 6
Diuron	-	-	-	-
Metalaxil	4.6	523 ± 20	3.6	1304 ± 26

Es importante destacar que a pH= 3, fue el herbicida aniónico clopiralida el que mostró la mayor diferencia entre la adsorción a la arcilla modificada con quitosano y a la arcilla sin modificar. Este herbicida prácticamente no se adsorbió a la arcilla original, mientras que mostró casi un 40% de adsorción a la muestra SW-CH-4 (Fig. III.14). El comportamiento observado para clopiralida puede explicarse atendiendo a las características de carga del adsorbente y el adsorbato. A pH 7, la clopiralida ( $pK_a = 2.1$ ) se encuentra mayoritariamente en su forma aniónica y es repelida por la carga negativa que presentan las partículas tanto de SWy-2 como de SW-CH-4 a este valor de pH (Fig. III.12 y III.13). A pH 3, la clopiralida sigue encontrándose mayoritariamente (90%) en forma aniónica, pero mientras la arcilla sin tratar mantiene una carga superficial neta negativa (Fig. III.12), el complejo SW-CH-4 invierte su carga superficial por la protonación de los grupos aminos ionizables del polímero orgánico (Fig. III.13). Estas cargas positivas representan centros de adsorción para la clopiralida aniónica, haciendo que SW-CH-4 tenga buenas propiedades adsorbentes para el herbicida a niveles de pH en los que el biopolímero presente sus grupos aminos protonados.

### III.3.3. Aplicaciones relacionadas con la adsorción de plaguicidas aniónicos: la clopiralida

Sobre la base de los resultados obtenidos en apartado anterior, se decidió seleccionar la clopiralida como ejemplo de plaguicida por el que los complejos montmorillonita-quitosano podrían resultar particularmente interesantes como adsorbentes, profundizando en el proceso de adsorción de este herbicida a los complejos e ilustrando algunas posibles aplicaciones de



éstos últimos como adsorbentes del herbicida. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

### **III.3.3.1. Estudios de adsorción en medio acuoso**

#### **III.3.3.1.1. Efecto del pH en la adsorción**

La Tabla III.10 muestra los resultados del estudio detallado del efecto del pH en la adsorción de clopiralida al complejo SW-CH-1. La tendencia se muestra gráficamente en la Fig. III.15.

Tabla III.10. Efecto del pH en la adsorción de clopiralida a la muestra SW-CH-1.

pH inicial	pH equilibrio	% Ads	Cs(mg/kg)	Kd(l/kg)
2.0	2.0 ± 0.01	0	0	0
3.1	3.3	21 ± 1	79 ± 2.7	105 ± 4
3.3	3.5	23 ± 1	87 ± 2.7	120 ± 5
4.2	5.5 ± 0.1	0	0	0
6.7	6.5 ± 0.2	0	0	0

Los resultados de la Tabla III.10 y la Fig. III.15 confirman que el complejo SW-CH es un buen adsorbente de clopiralida en el rango de pH en el cual predominan la forma aniónica del herbicida ( $pK_a = 2.1$ ) y la forma catiónica del polímero orgánico ( $pK_a = 6.3$ ), es decir, en un rango de pH aproximado de 3 a 5. La adsorción de la clopiralida al complejo SW-CH viene determinada, por tanto, por la presencia de sitios superficiales con carga positiva en el complejo montmorillonita-quitosano. Dicha adsorción sería debida a un mecanismo de intercambio aniónico por el que el herbicida sustituiría a los aniones que compensan la carga positiva de los grupos aminos protonados del SW-CH-1, probablemente acetatos, tal y como han sugerido otros autores para otras especies aniónicas (Darder et al., 2005; An and Dultz, 2007b; Boddu et al., 2008; Ganigar et al., 2010)

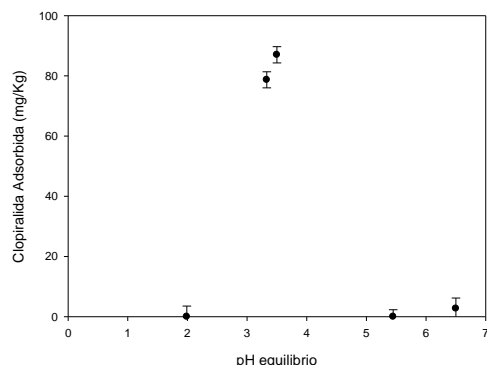


Fig. III.15. Efecto del pH en la adsorción de clopiralida al complejo SW-CH-1.

Cuando el pH es muy bajo, como en el caso de las pruebas a  $\text{pH} < 3$ , la carga del quitosano se hace más positiva y elevada, pero al predominar la clopiralida en su forma neutra, se produce una escasa adsorción de ésta al complejo SW-CH (Fig. III.15).

A niveles de pH elevados, como en el caso de las pruebas a  $\text{pH} > 5$ , encontramos la clopiralida en su forma aniónica, pero el complejo SW-CH-1 empieza a perder su carga positiva, por lo que disminuyen rápidamente los sitios de adsorción para los aniones de clopiralida.

Es interesante destacar que a pesar de que el quitosano está presente en el complejo SW-CH-1 en una cantidad correspondiente a sólo un 47% de la CIC de la arcilla (Tabla III.4), a valores de pH próximos a 3 el complejo SW-CH-1 parece contener algunos grupos  $\text{NH}_3^+$  con propiedades de intercambio aniónico, presumiblemente porque no están directamente involucrados en la interacción con las cargas interlaminares de la arcilla (Darder et al., 2003), sino asociados a su superficie externa como sugieren las fotografías SEM y los diagramas de XRD.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de adsorción a diferentes niveles de pH, los siguientes experimentos de adsorción se realizaron a un pH inicial de 3, al que la clopiralida mostró una máxima adsorción a los complejos.

#### **III.3.3.1.2. Cinética de la adsorción**

La Fig. III.16 muestra el efecto del tiempo de contacto en la adsorción de clopiralida al complejo SW-CH-1 a un pH inicial de 3. Se comprueba que la adsorción del herbicida al complejo se produce de forma muy rápida, alcanzándose un equilibrio aparente a los pocos minutos de contacto. Este comportamiento indica la elevada afinidad de la clopiralida por los sitios

cargados positivamente del biopolímero, así como la accesibilidad de éstos últimos, que hacen que el equilibrio de adsorción se alcance rápidamente.

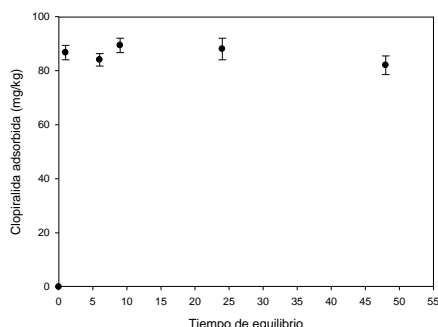


Fig. III.16. Cinética de adsorción de la clopiralida al complejo SW-CH-1.

### III.3.3.1.3. Adsorción-desorción a los diferentes complejos SW-CH

Sobre la base de los resultados obtenidos en los experimentos de adsorción a diferentes niveles de pH y diferentes tiempos de contacto, la capacidad adsorbente de los diferentes complejos SW-CH preparados en este trabajo se comparó mediante experimentos realizados a un pH inicial de 3 y un tiempo de agitación de 24 h. La Tabla III.11 muestra los coeficientes de adsorción de clopiralida a los diferentes complejos SW-CH a una concentración inicial de 1 mg/l (0.005 mM) y en la Fig. III.17 se muestran las isotermas de adsorción de clopiralida sobre complejos seleccionados en un intervalo de concentraciones iniciales del herbicida entre 0.1 y 500 mg/l (0.0005-0.5 mM). La gráfica insertada muestra una ampliación de la región de concentraciones más bajas estudiadas (Fig. III.17).

Tabla III.11. Porcentaje de clopiralida adsorbida a los diferentes complejos SW-CH a una concentración inicial de 1 mg/l, coeficientes de distribución ( $K_d$ ) obtenidos experimentalmente y valor de  $K_d$  normalizado al contenido de quitosano de cada muestra.

Muestras	pH inicial	pH equilibrio	% Ads	$K_{d-1}$ mg/l (l/kg)	$K_{d-Chit}$ (l/kg)
SW-CH-1	3.0	3.3	$15 \pm 1^a$	$71 \pm 7$	1014
SW-CH-2	3.0	3.4	$20 \pm 1$	$102 \pm 2$	1397
SW-CH-3	3.0	3.4	$12 \pm 1$	$52 \pm 3$	812
SW-CH-4	3.0	3.7	$39 \pm 1$	$252 \pm 14$	2312
SW-CH-5	3.0	3.9	$36 \pm 1$	$214 \pm 5$	1466
SW-CH-6	3.0	4.5	$55 \pm 2$	$501 \pm 37$	1149

<sup>a</sup> media  $\pm$  error estándar

En general, la adsorción de clopiralida fue mayor para los complejos que presentaban mayores cantidades de quitosano (Tabla III.11 y Fig. III.17). No obstante, la variabilidad de los coeficientes de distribución normalizados con respecto al contenido de quitosano de las muestras,  $K_{d-chit}$  (Tabla III.11), indica que factores adicionales, como el pH final o la diferente accesibilidad de los sitios de adsorción, también podrían haber sido importantes en la cantidad final de clopiralida adsorbida por cada complejo.

Por ejemplo, la adsorción de clopiralida en el complejo SW-CH-2, que se preparó a una temperatura de 60 °C, fue significativamente más alta que para el complejo SW-CH-1, preparado a 25 °C, a pesar de que ambas muestras presentaron cantidades similares de quitosano (Tablas III.4 y III.11). Un aumento de la temperatura a la cual se llevó a cabo la síntesis de los complejos, aunque no afectó en gran medida a la cantidad de quitosano intercalado, podría haber dado lugar a una disposición diferente del biopolímero asociado a la arcilla, en la que los grupos  $-NH_3^+$  del biopolímero presentarían una mayor accesibilidad.

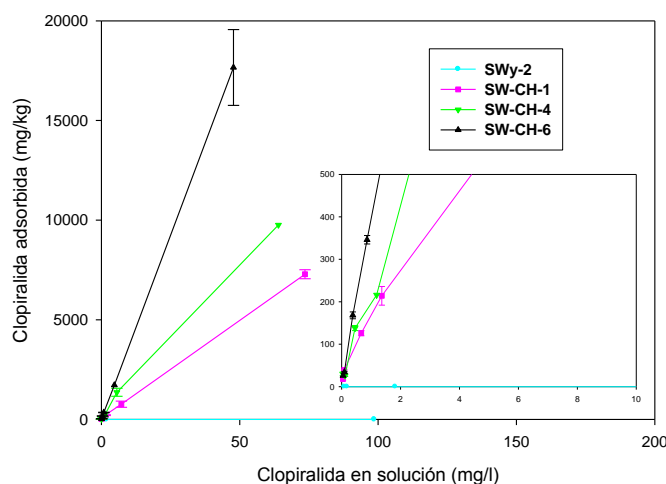


Fig. III.17. Isotermas de adsorción de clopiralida a diferentes complejos SW-CH a pH 3.

De manera similar, para los complejos SW-CH-4, SW-CH-5 y SW-CH-6 los coeficientes de adsorción normalizados con respecto al contenido de quitosano de cada complejo,  $K_{d-chit}$ , disminuyeron con la cantidad de biopolímero en el complejo (Tabla III.11). Este comportamiento es similar al encontrado en estudios anteriores para la adsorción de plaguicidas en otros complejos organo-arcillosos (Cornejo et al., 2008) y podría reflejar una cierta obstrucción del

espacio interlamilar y/o una disminución de la superficie expuesta para la adsorción del herbicida a elevadas cantidades de biopolímero presente en las muestras. La morfología de los complejos, mostrando una mayor porosidad y mayor superficie expuesta en el caso de SW-CH-4 en comparación con SW-CH-6 (Fig. III.11), apoya la última hipótesis.

Las **isotermas de adsorción** de la clopiralida a los complejos SW-CH revelaron una forma prácticamente lineal hasta elevadas concentraciones de herbicida (Fig. III.17). Se modelizaron ajustándolas a la ecuación de Freundlich, cuyos parámetros se incluyen en la Tabla III.12.

Tabla III.12. Constantes de Freundlich para la adsorción de clopiralida a complejos SW-CH seleccionados.

Muestras	$K_f$	$N_f$	$R^2$
SW-CH-1	64 (52-79)	0.79 (0.75-0.83)	0.991
SW-CH-4	124 (78-196)	0.86 (0.78-0.94)	0.967
SW-CH-6	340 (297-390)	0.97 (0.95-0.99)	0.998

Los valores de  $K_f$  obtenidos para los complejos SW-CH-1, CH-SW-4 y SW-CH-6 fueron ligeramente inferiores a los valores de  $K_d$  obtenidos para la clopiralida a una concentración inicial de 1 mg/l (Tabla III.11). Al aumentar la cantidad de quitosano en el complejo, se observó un aumento de la  $K_f$  y de la linealidad de las isotermas de adsorción, tal y como reflejan los valores de  $N_f$  haciéndose más próximos a la unidad (Tabla III.12).

Los valores de los coeficientes de adsorción obtenidos en nuestros experimentos con clopiralida son, en general, mayores que los encontrados por otros autores para la adsorción de otros plaguicidas ácidos como el imazamox, imazetapir, 2,4-D o dicamba a complejos organo-arcillosos preparados a partir de la montmorillonita SWy-2 (Hermosín y Cornejo, 1992; Zhao et al., 1996; Celis et al., 1999b; Cruz-Guzmán et al., 2005). La morfología resultante de la combinación de la estructura laminar de la montmorillonita con la del quitosano (Fig. III.10) parece favorecer la disponibilidad y la eficiencia del polímero orgánico, en particular de sus grupos  $NH_3^+$ , en la adsorción del plaguicida.

La Fig. III.18 muestra el comportamiento de **desorción** de la clopiralida en las muestras SW-CH-4 y SW-CH-6. Los pasos de desorción se realizaron usando dos extractantes diferentes: agua y una disolución de NaCl 0.1 M. La desorción de la clopiralida con agua se produjo lentamente, particularmente en

el complejo con mayor capacidad adsorbente (SW-CH-6). En este complejo el herbicida podría haber permanecido en sitios de adsorción menos accesibles para las moléculas de agua y atraído por fuerzas iónicas catión (grupos aminos protonados)-anión (carboxilato) y, por lo tanto, más resistentes a la desorción en comparación con el SW-CH-4.

Por el contrario, cuando se usó una disolución de NaCl 0.1 M para la desorción del herbicida, dicha desorción ocurrió muy rápidamente, tanto para el complejo SW-CH-4 como para el SW-CH-6 (Fig. III.18). Este comportamiento podría reflejar una fuerte competencia entre el herbicida y los aniones  $\text{Cl}^-$  por los sitios de adsorción, apoyando que la adsorción de clopiralida se produce principalmente a través de un mecanismo de intercambio aniónico sobre las cargas positivas del quitosano presente en los complejos, produciéndose una desorción rápida en presencia de elevadas concentraciones de la sal inorgánica por la formación de la sal soluble de clopiralida (Zheng et al., 2004).

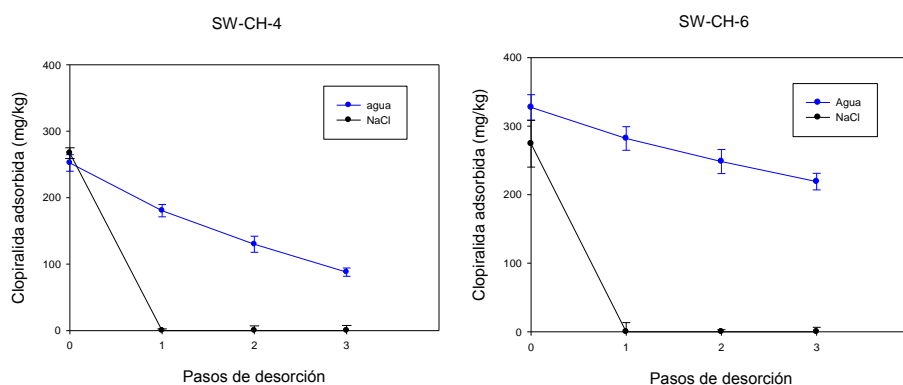


Fig. III.18. Desorción de clopiralida de las muestras SW-CH-4 y SW-CH-6 tras diluciones sucesivas con agua y NaCl 0.1 M.

### III.3.3.2. Estudios de adsorción en suelos enmendados

Los dos complejos que presentaron una mayor afinidad por la clopiralida (SW-CH-5 y SW-CH-6) se seleccionaron para ser utilizados como enmiendas en distintos suelos y de esta forma poder evaluar la capacidad que poseían dichos complejos para inmovilizar la clopiralida. Se realizaron experimentos utilizando el suelo 1 y el suelo 2 (Tabla III.3) enmendados al 0%, 5% y 10% con los dos complejos mencionados.

Como puede observarse en la Tabla III.13, la modificación del suelo ácido (suelo 1) con SW-CH-5 y SW-CH-6 en proporciones del 5% y 10% provocó un aumento significativo en la adsorción de la clopiralida, lo cual puede ser atribuido a la prevalencia de los sitios de intercambio aniónico en el complejo SW-CH debido a que el pH de las suspensiones suelo/agua fue próximo a 5.

Por el contrario, la adsorción fue despreciable cuando los complejos SW-CH fueron añadidos a un suelo alcalino cuyo pH era 8.0 (suelo 2), lo que manifiesta posiblemente la ausencia de sitios con carga positiva en los complejos SW-CH debido a que, a tan alto valor de pH, los grupos aminos del biopolímero se desprotonan, perdiendo su carga (Boddu et al., 2008).

Los coeficientes de distribución medidos experimentalmente ( $K_{d-exp}$ ) para la adsorción de clopiralida en los suelos enmendados con los complejos SW-CH se compararon con los valores teóricos ( $K_{d-calc}$ ) calculados suponiendo un comportamiento independiente en cuanto a la adsorción del suelo y el complejo SW-CH en las mezclas (Tabla III.13). Dado que la adsorción es lineal, tales valores esperados pueden calcularse de acuerdo con la ecuación:

$$K_{d-calc} = K_{d-suelo}f_{suelo} + K_{d-SW-CH}f_{SW-CH}$$

donde:

$K_{d-suelo}$  y  $K_{d-SW-CH}$  son los coeficientes de distribución individuales para la adsorción de clopiralida en el suelo y en el complejo, mientras que  $f_{suelo}$  y  $f_{SW-CH}$  son la fracción de suelo y de complejo en la mezcla, respectivamente (Rodríguez-Cruz et al., 2007; Gámiz et al., 2010).

Hay que señalar que, aunque los complejos produjeron un notable incremento de la adsorción de clopiralida en presencia del suelo 1, el aumento fue menor al esperado a partir de las constantes de adsorción individuales y de la fracción de suelo y de complejo en las mezclas ( $K_{d-exp} < K_{d-calc}$ ).

Este resultado reveló que los complejos fueron menos eficaces para la adsorción de clopiralida en presencia de suelo que en ausencia de éste, probablemente a causa de la interacción de los componentes solubles del suelo con los complejos, entre ellos muchas sales e incluso parte de la materia orgánica soluble que incluye grupos ácidos. Es posible que estos procesos de interacción lleven a fenómenos de competencia por los sitios de adsorción o a efectos de bloqueo de los mismos, provocando una reducción del rendimiento de los complejos añadidos al suelo en la adsorción de clopiralida.

Tabla III.13. Coeficientes de adsorción de la clopiralida en suelos sin enmendar y enmendados a diferentes porcentajes con complejos SW-CH.

Muestras	pH inicial	pH equilibrio	% Ads	$K_{d-exp}$ (l/kg)	$K_{d-calc}$ (l/kg)
Suelo 1	6.5	4.7	5	$0.7 \pm 0.1$	0.7
Suelo 1 + SW-CH-5 (5%)	6.5	4.8	10	$1.7 \pm 0.3$	11.3
Suelo 1 + SW-CH-5 (10%)	6.5	4.9	18	$3.6 \pm 0.1$	22.0
Suelo 1 + SW-CH-6 (5%)	6.5	5.0	26	$5.6 \pm 0.3$	25.7
Suelo 1 + SW-CH-6 (10%)	6.5	5.1	38	$10.0 \pm 0.2$	50.7
Suelo 2	6.5	8.0	< 5	< 0.5	< 0.5
Suelo 2 + SW-CH-5 (5%)	6.5	8.0	< 5	< 0.5	10.7
Suelo 2 + SW-CH-5 (10%)	6.5	8.0	< 5	< 0.5	21.4
Suelo 2 + SW-CH-6 (5%)	6.5	8.1	< 5	< 0.5	25.0
Suelo 2 + SW-CH-6 (10%)	6.5	8.1	< 5	< 0.5	50.1

### III.3.3.3. Evaluación de los complejos como soportes para la liberación lenta del herbicida

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en los experimentos diseñados para evaluar la capacidad de los complejos SW-CH de actuar como soportes del herbicida clopiralida para una liberación lenta del mismo. En primer lugar, se prepararon formulaciones de los complejos SW-CH con el herbicida adsorbido para, posteriormente, estudiar la lixiviación del herbicida en columnas de suelo y su bioeficacia, comparándolas con las del herbicida libre no soportado.

#### III.3.3.3.1. Características de las formulaciones

Para la síntesis de los complejos SW-CH-Clopiralida, se utilizaron las muestras que presentaron mayor afinidad por el herbicida: SW-CH-4, SW-CH-5 y SW-CH-6. Estas muestras se pusieron en contacto con una disolución de clopiralida de 100 mg/l a pH 3, tras lo cual se filtró al vacío para recuperar el complejo SW-CH-Clopiralida, según se describe en el apartado III.2.2.4.3.1.

La cantidad final de clopiralida adsorbida en las formulaciones SW-CH-Clopiralida se calculó de forma indirecta, a partir de la cantidad no adsorbida, y también directamente mediante extracción del herbicida con una disolución de NaCl 0.1 M. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla III.14.

Tabla III.14. Contenido de clopiralida en las formulaciones SW-CH-Clopiralida preparadas.

Formulación	% Clopiralida (método indirecto)	% Clopiralida (método directo)
SW-CH-4-Clopiralida	0.90	0.95
SW-CH-5-Clopiralida	1.38	1.43
SW-CH-6-Clopiralida	1.13	1.48



Puede observarse cómo los contenidos de herbicida obtenidos por los dos métodos fueron similares, considerándose los obtenidos por el método directo para el resto de los experimentos por su mayor precisión.

### III.3.3.3.2. Estudios de lixiviación

En las Fig. III.19 y III.20 aparecen representadas las curvas de lixiviación de la clopiralida en columnas de suelos 1 y 2 tras haberles aplicado el herbicida bien en forma libre (disuelto en agua) bien soportado en forma de complejo (SW-CH-Clopiralida). La aplicación de la formulación SW-CH-Clopiralida a los dos suelos se realizó de dos formas distintas, directamente en superficie y enterrando la formulación a 1 cm de profundidad.

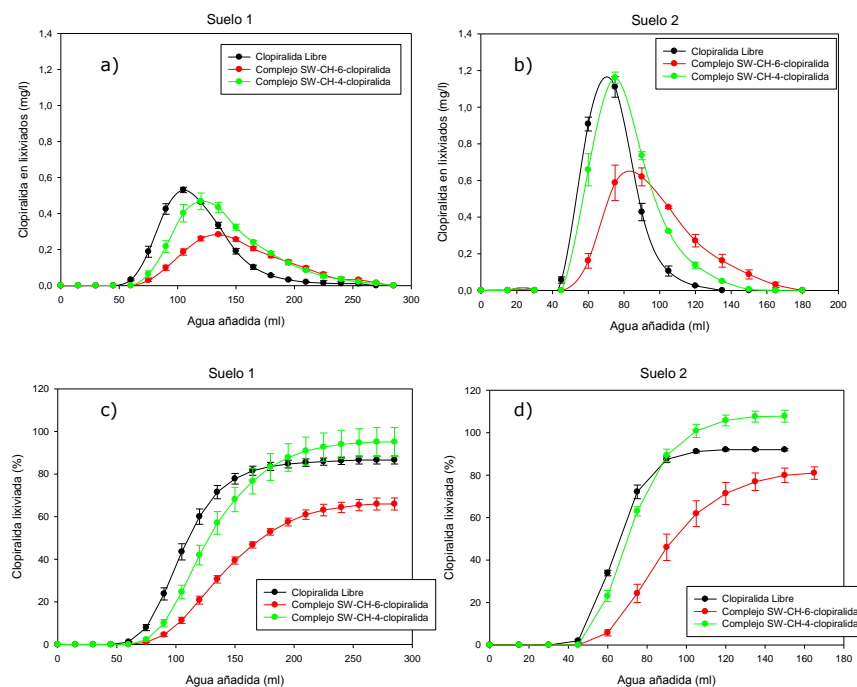


Fig. III.19. Curvas de elución relativas (a y b) y acumuladas (c y d) de los complejos SW-CH-4-Clopiralida y SW-CH-6-Clopiralida para el suelo 1 (a y c) y suelo 2 (b y d), con aplicación de los complejos en superficie.

Como se puede observar en la Fig. III.19, para la aplicación en superficie, se produjo un retraso en la lixiviación del herbicida al aplicarlo en forma de complejo SW-CH-Clopiralida respecto a su aplicación en forma libre disuelto en agua, tanto en el suelo ácido (suelo 1) como en el alcalino (suelo 2). Dicho retraso se produjo para los dos complejos utilizados, SW-CH-4-Clopiralida

y SW-CH-6-Clopiraldida, siendo el complejo SW-CH-6-Clopiraldida el que más retrasó y redujo la lixiviación, coincidiendo con la gran cantidad de quitosano presente en el mismo (Tabla III.11).

Por otra parte, se realizó un estudio comparativo utilizando el complejo SW-CH-5-Clopiraldida, que se aplicó a las columnas de suelo tanto en superficie como incorporado a 1 cm de profundidad, comparando su perfil de lixiviación con el del herbicida libre disuelto en agua (Fig. III.20). Mientras que con la aplicación en superficie el complejo dio lugar a un retraso en la lixiviación tanto en el suelo ácido como en el alcalino, tras la incorporación a 1 cm de profundidad la lixiviación sólo se retrasó en el suelo ácido (suelo 1). Este comportamiento puede atribuirse a la destrucción del complejo adsorbente-herbicida tras su incorporación a una cierta profundidad en el suelo alcalino, lo que dio lugar a una rápida liberación del herbicida, resultado que está de acuerdo con los datos de adsorción de los suelos enmendados con SW-CH (Tabla. III.13).

Estos resultados ponen de manifiesto que la forma de aplicación de la formulación y el pH del suelo son factores determinantes del patrón de liberación y lixiviación del herbicida clopiraldida soportado en el complejo montmorillonita-quitosano.

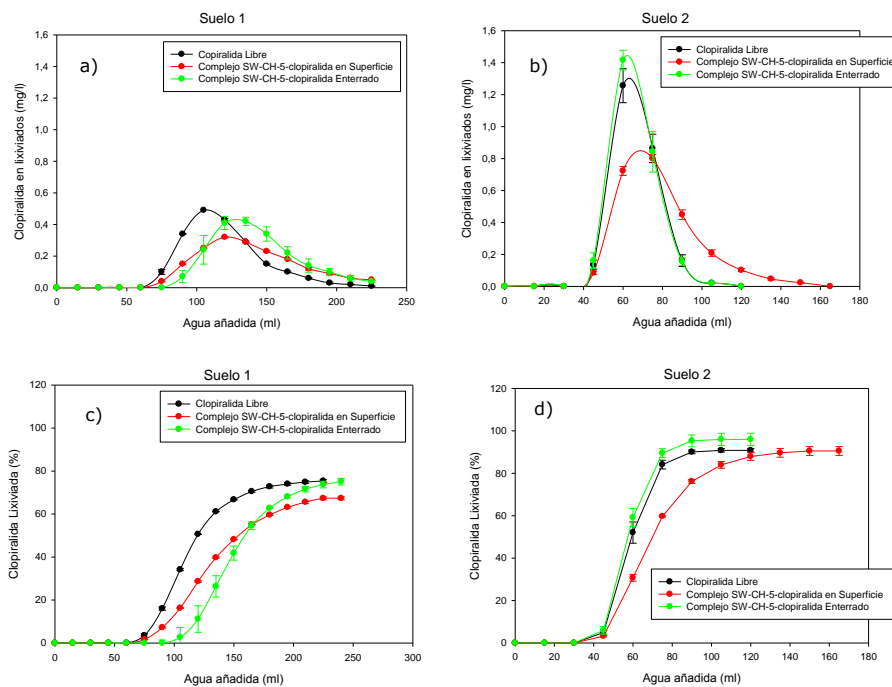


Fig. III.20. Curvas de elución relativas (a y b) y acumuladas (c y d) del complejo SW-CH-5-Clopiraldida para el suelo 1 y suelo 2, aplicado en superficie e incorporado a 1 cm de profundidad.

En las curvas de lixiviación acumuladas podemos observar las cantidades totales de herbicida recuperadas en los lixiviados. Las curvas acumuladas obtenidas para el herbicida libre muestran una recuperación del 75% del herbicida añadido en el caso del suelo 1 (ácido) y más próxima al 100% en el caso del suelo 2 (alcalino). Dado que no se detectó cantidad alguna de clopiralida en el interior de las columnas de suelo al finalizar el experimento de lixiviación, la cantidad no recuperada en el suelo 1 debe atribuirse a degradación del herbicida y/o a una adsorción irreversible al suelo durante el experimento.

Las curvas acumuladas obtenidas tras la aplicación del complejo muestran que, si bien se produce un retraso en la lixiviación en el suelo 1 para los dos modos de aplicación y en el suelo 2 para la aplicación en superficie, las cantidades totales lixiviadas fueron próximas a las obtenidas para el herbicida libre, sobre todo para la aplicación enterrada.

#### III.3.3.3. Bioensayos

**a) Bioensayo general:** En primer lugar, se realizó un bioensayo con el fin de comprobar la eficacia biológica del herbicida clopiralida para distintas formas de aplicación: soportado en el complejo SW-CH-6-Clopiralida y aplicado directamente como disolución acuosa a macetas con el suelo 2 en las que se habían sembrado semillas de *Lactuca sativa*.

En la Fig. III.21 está representada la eficacia de la clopiralida, dependiendo del tipo de aplicación, en forma de reducción del peso herbáceo fresco respecto a las macetas control (sin herbicida) dos semanas después de la siembra y aplicación del herbicida. En las macetas en las que se aplicó clopiralida, tanto en forma libre como de complejo, se produjo una inhibición del crecimiento de las plántulas, en comparación con el crecimiento observado en las macetas control sin herbicida (Fig. III.22). Esta inhibición fue prácticamente total para las dos formas de aplicación a la dosis recomendada de herbicida de 0.5 kg/ha.

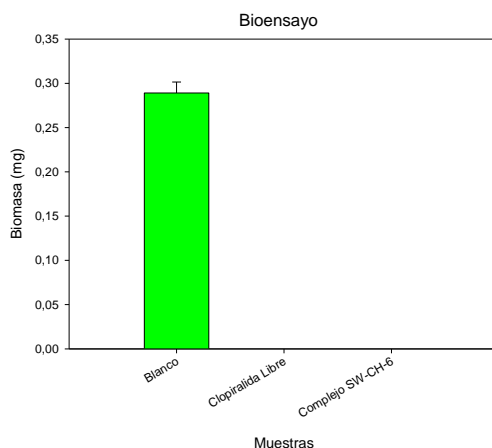


Fig. III.21. Peso herbáceo fresco de las macetas sin herbicida (Blanco), con herbicida libre (disolución acuosa) y con el herbicida soportado en el complejo SW-CH-6 dos semanas después de la siembra y aplicación del herbicida.



Fig. III.22. Estado de las macetas dos semanas después de la siembra y aplicación del herbicida en forma libre y en forma de complejo SW-CH-6-Clopiralida.

**b) Bioensayo con simulación de alto riesgo de lixiviación:** Tras los datos obtenidos en el bioensayo general, se diseñó un nuevo experimento para verificar si la aplicación en forma de complejo SW-CH-Clopiralida podría aumentar la eficacia del herbicida en condiciones de un aporte de agua abundante poco después de la aplicación del producto fitosanitario, como resultado de una disminución de las pérdidas por lixiviación.

En la Fig. III.23 se representa el peso herbáceo fresco obtenido de las macetas transcurridas dos semanas desde la siembra, aplicación del herbicida y aporte de una cantidad de agua equivalente a 40 l/m<sup>2</sup>. La Figura muestra que para las macetas donde se aplicó el herbicida en forma libre (disolución acuosa), la biomasa obtenida fue similar a la de las macetas a las que no se había

aplicado herbicida, mientras que para aquellas a las que se había aplicado el complejo SW-CH-6-Clopiralida, la biomasa obtenida fue sensiblemente inferior. Estos resultados concuerdan con la cantidad de semillas germinadas, pues en las macetas donde se aplicó el herbicida en forma de complejo no se observó germinación, mientras que en las macetas donde se aplicó el herbicida libre crecieron un número de plántulas similar a las que lo hicieron en las macetas control sin herbicida (Fig. III.24).

El análisis de los lixiviados de las macetas reveló que, tras el aporte de agua de 40 l/m<sup>2</sup>, el 86% del herbicida aplicado en forma libre se había perdido por lixiviación, mientras que para las macetas donde se aplicó el complejo las pérdidas por lixiviación del herbicida se limitaron a un 70%. Por lo tanto, tras el aporte de agua, el complejo SW-CH-Clopiralida fue capaz de retener un 15% más de herbicida, que resultó ser una cantidad suficiente para que ejerciera su función, con una mejora de la eficacia biológica respecto a la aplicación del herbicida libre disuelto en agua, para la que la mayor pérdida de herbicida redujo considerablemente su rendimiento.

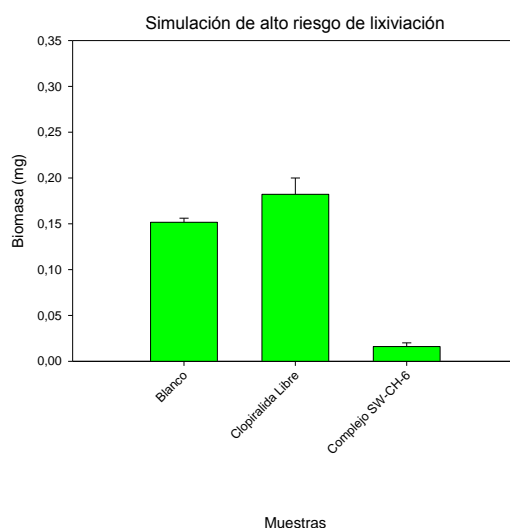


Fig. III.23. Peso herbáceo fresco de las macetas sin herbicida (Blanco), con herbicida libre (disolución acuosa) y soportado en el complejo SW-CH-6-Clopiralida dos semanas después de la siembra, aplicación del herbicida y aporte de 40 l/m<sup>2</sup> de agua.



Fig. III.24. Resultado del bioensayo con simulación de alto riesgo de lixiviación.

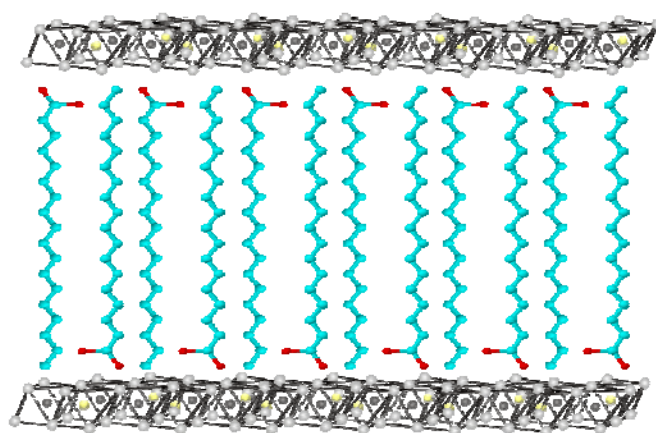
A la luz de los resultados obtenidos, es de destacar que una situación real análoga a la simulada en este experimento probablemente hubiera obligado a una segunda aplicación del herbicida si éste hubiera sido aplicado en forma libre, aplicación que podría haberse evitado con el uso del herbicida soportado en el complejo montmorillonita-quitosano.

#### III.4. CONSIDERACIONES FINALES

- El pH de la suspensión se muestra como un factor decisivo en la síntesis de los complejos SW-CH, ya que un aumento del pH provoca una disminución de la protonación del biopolímero y un aumento de la cantidad adsorbida en la arcilla.
- La caracterización de los complejos (análisis elemental, XRD, FT-IR, SEM, potencial Z) permite comprobar cómo el biopolímero se intercala en el espacio interlaminar de la arcilla, inducido por las interacciones entre las cargas negativas de la arcilla con los grupos aminos protonados del quitosano, aunque también se asocia en gran parte a la superficie externa resultando estructuras laminares más grandes.
- Se observó una mejora en la adsorción de distintos plaguicidas en los complejos SW-CH respecto a la arcilla original sin tratar a pH 7 y pH 3. A pH 3 fue el herbicida ácido clopiralida el que presentó una mayor diferencia de adsorción entre la arcilla modificada con quitosano y la arcilla sin modificar.
- Los complejos SW-CH fueron buenos adsorbentes de clopiralida en el rango de pH en el cual predomina la forma aniónica del herbicida y la forma catiónica del quitosano, es decir, en un rango aproximado de 3 a

5. Se comprobó cómo la adsorción de clopiralida es rápida alcanzándose el equilibrio a los pocos minutos de estar en contacto con el adsorbente.

- La adsorción de clopiralida a los complejos SW-CH a pH 3 aumentó con la cantidad de quitosano presente en los complejos. La morfología de la combinación SW-CH favorece la disponibilidad y la eficacia de los grupos  $\text{NH}_3^+$  del quitosano en la adsorción del plaguicida. En los estudios de desorción, cuando se utilizó agua como extractante la desorción fue más lenta que cuando se utilizó NaCl, lo que apoya un mecanismo de adsorción por cambio aniónico entre la clopiralida en su forma aniónica y las cargas positivas del quitosano presente en los complejos.
- La adición de complejos SW-CH al suelo 1 (ácido) aumentó significativamente la adsorción de clopiralida debido a la existencia de cargas positivas en los complejos al pH de las suspensiones suelo:agua. En cambio, la adición de los complejos al suelo 2 (alcalino), no supuso un aumento de la adsorción de clopiralida, probablemente por la ausencia de sitios con carga positiva en los complejos SW-CH debido al pH básico de las suspensiones.
- Los estudios de lixiviación en columnas de suelo demuestran que la aplicación del herbicida clopiralida como formulaciones de liberación lenta SW-CH-Clopiralida puede reducir la movilidad del herbicida en suelos. La forma de aplicación de la formulación y el pH del suelo son factores determinantes del patrón de liberación y lixiviación del herbicida formulado en complejos montmorillonita-quitosano, produciéndose una mayor reducción en la lixiviación cuando éstos se aplican a suelos ácidos y en superficie (no enterrados).
- Los bioensayos realizados en condiciones de laboratorio demostraron la eficacia biológica de las formulaciones SW-CH-Clopiralida a dosis próximas a las recomendadas para este herbicida. También demostraron que en una situación de aporte de agua abundante poco después de la aplicación del herbicida, las formulaciones SW-CH-Clopiralida pueden ser útiles para reducir las pérdidas por lixiviación del herbicida y aumentar su eficacia respecto al uso del herbicida libre o formulado en una forma inmediatamente disponible.



#### IV. Estudio del sistema hidrotaicita-ácidos grasos insaturados





**IV.1. INTRODUCCIÓN**

Los hidróxidos dobles laminares (LDHs), también conocidos como materiales tipo hidrotalcita o arcillas aniónicas, están formados por láminas cargadas positivamente y una región interlaminar en la que se encuentran especies aniónicas, dando una situación inversa a la que ocurre en las arcillas catiónicas (Fig. IV.1).



Fig. IV.1. Esquema comparativo de la estructura de las arcillas catiónicas y aniónicas.

Su estructura laminar está basada en la que posee la brucita  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , pero con sustituciones isomórficas de cationes  $\text{Mg}^{2+}$  (u otro catión divalente) por cationes con mayor carga ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , etc.) que originan un exceso de carga positiva en las láminas que se compensa por la incorporación de aniones en el espacio interlaminar. Aunque existen en la naturaleza sólo en pequeñas cantidades (Cavani et al., 1991), son materiales muy fáciles de sintetizar en el laboratorio por co-precipitación de los cationes metálicos necesarios para formar las láminas en presencia del anión interlaminar.

Debido a las propiedades físico-químicas de los LDHs, en las últimas dos décadas ha aumentado el interés por el uso de dichos materiales en distintas áreas tan diversas como son la medicina (Choy et al., 2007; Ladewig et al., 2010), la síntesis de biopolímeros (Alcántara et al., 2010), la farmacología y la química (Gordijo et al., 2005; Gunawan y Xu, 2007; Parello et al., 2010), la agricultura (Cornejo et al., 2008), como catalizadores respetuosos con el medio ambiente (Corma et al., 1994; Tichit et al., 1997; Jiang et al., 2011) y como adsorbentes para la remediación de suelos, sedimentos y aguas por su capacidad para inmovilizar contaminantes inorgánicos y orgánicos (Hermosín et al., 1996; Pavlovic et al., 1996; Ulibarri et al., 2001; Inacio et al., 2001; Lazaridis y Asouhidou, 2003; Cardoso et al., 2003; Zhao y Nagy, 2004; Pavlovic et al., 2005).

De forma análoga a lo que ocurre con las arcillas catiónicas, los LDHs pueden modificarse incorporándoles aniones orgánicos en el espacio interlaminar (Meyn et al., 1990). Dicha modificación aumenta la hidrofobicidad de los LDHs y, al igual que en el caso de las organo-arcillas catiónicas, los hace interesantes en aplicaciones relacionadas con su uso como soportes de especies poliméricas y como adsorbentes de compuestos orgánicos (Inomata y Ogawa, 2006; Cornejo

et al., 2008; Manzi-Nshuti et al., 2009; Iyi et al., 2009; Bruna et al., 2012). Los aniones orgánicos más utilizados para la obtención de organo-LDHs han sido surfactantes aniónicos de cadena larga como alquil-sulfatos, alquil-sulfonatos y alquil-carboxilatos (Pavlovic et al., 1997; Xu et al., 2004; Xu y Braterman, 2010), los cuales se han incorporado en LDHs siguiendo procedimientos similares a los utilizados para la preparación de LDHs inorgánicos, es decir, coprecipitación, reconstrucción a partir del producto calcinado e intercambio iónico (Iyi et al., 2009). Los factores que afectan a la reacción de incorporación de estos aniones en la interlámina siguen siendo objeto de estudio en la actualidad, ya que comenzaron con posterioridad a los correspondientes a las organo-arcillas tradicionales (Inomata y Ogawa, 2006; Xu y Braterman, 2010)

En relación con su posible uso como adsorbentes de compuestos orgánicos, se ha demostrado que los LDHs modificados con aniones orgánicos presentan una elevada afinidad por muchos plaguicidas y pueden ser útiles en aplicaciones tales como la depuración de aguas contaminadas, la inmovilización de plaguicidas en suelos e incluso la preparación de formulaciones de liberación controlada de plaguicidas (Pavlovic et al., 1996; Celis et al., 1999b; Villa et al., 1999; Wang et al., 2005; Bruna et al., 2006, 2008; Cornejo et al., 2008; Pavlovic et al., 2013). Entre los estudios realizados en este sentido destacan los que han utilizado el surfactante aniónico dodecilsulfato como anión modificador; sólo en escasas ocasiones se ha investigado la adsorción de plaguicidas en organo-LDHs preparados a partir de otros aniones modificadores como el dodecibencensulfonato, sebacato, tetradecanodioato o caprilato (Celis et al., 1999b; Bruna et al., 2008; Otero et al., 2012; Pavlovic et al., 2013).

Los ácidos grasos son compuestos orgánicos que, en sus formas aniónicas, presentan una estructura compatible para ser utilizados como agentes modificadores de LDHs y, de hecho, diversos trabajos han estudiado la incorporación de ácidos grasos en LDHs y caracterizado la estructura de los productos resultantes de tal incorporación (Xu et al., 2004; Inomata y Ogawa, 2006; Kameshima et al., 2006; Iyi et al., 2009; Manzi-Nshuti et al., 2009; Xu y Braterman, 2010; Donato et al., 2012).

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos formados por una cadena hidrocarbonada con un grupo funcional carboxílico (-COOH). En la naturaleza, los ácidos grasos suelen poseer un número par de átomos de carbono que oscila entre 4 y 28 y constituyen una fuente importante de energía para las células, ya que cuando son metabolizados producen grandes cantidades de ATP.

Se pueden clasificar dependiendo de:

- \* La longitud de la cadena: Los ácidos de *cadena corta* son aquellos que poseen menos de 6 átomos de C, los de *cadena media* poseen entre 6 y 12 átomos de C y los de *cadena larga* más de 12 átomos de C.

- \* La presencia o no de dobles enlaces en la cadena: Los ácidos grasos *saturados* son aquellos que no poseen ningún doble enlace en la cadena y los *insaturados* son los que presentan uno o más dobles enlaces. En el caso de los ácidos grasos insaturados, los dobles enlaces pueden presentar dos configuraciones, la configuración **cis**, en la cual los carbonos unidos por el doble enlace tienen los hidrógenos orientados en el mismo sentido, y la configuración **trans**, en la que los hidrógenos están orientados en sentidos opuestos, tal y como se representa esquemáticamente en la Fig. IV.2.

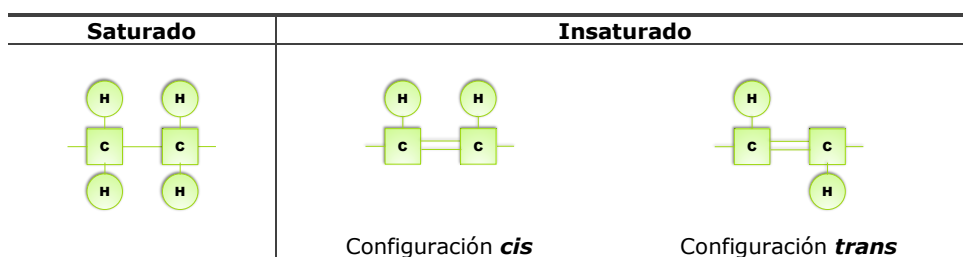


Fig. IV.2. Representación de los ácidos grasos saturados e insaturados y las configuraciones *cis* y *trans*.

La Fig. IV.3 muestra algunos ejemplos característicos tanto de ácidos grasos saturados como de ácidos grasos insaturados.

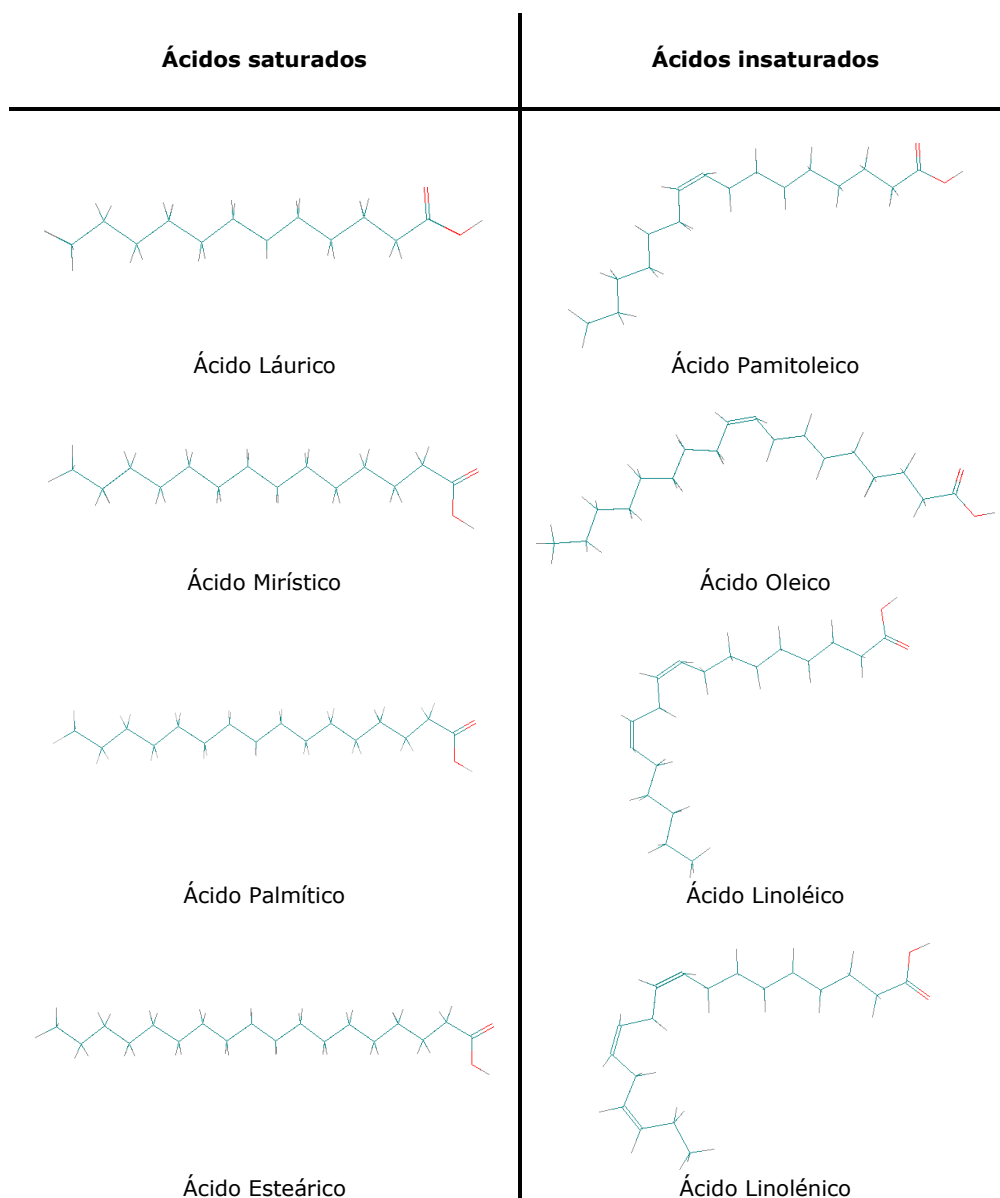


Fig. IV.3. Ejemplos de ácidos grasos saturados e insaturados

La presencia de dobles enlaces y de su configuración afecta no sólo a las propiedades físico-químicas de los ácidos grasos, sino también al empaquetamiento resultante de la interacción entre ellos para formar estructuras micelares. En la Fig. IV.4 se muestra un ácido graso saturado y otro insaturado con la misma longitud en la cadena hidrocarbonada (C18) y la esquematización del empaquetamiento de dichos ácidos con su parte polar ( $\text{COO}^-$ ) y apolar (cadena hidrocarbonada).

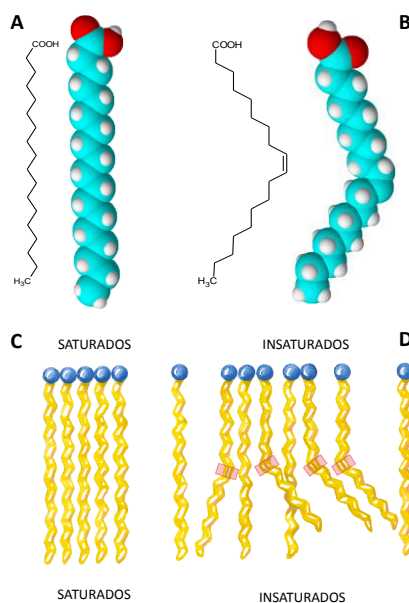


Fig. IV.4. Representación de la estructura de un ácido graso de cadena larga (C18) saturado (**A**) e insaturado (**B**) en el que el doble enlace (*cis*) no permite la rotación e introduce un pliegue rígido. El empaquetamiento de los ácidos grasos saturados se produce de forma ordenada (**C**), estabilizado por las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alquílicas, mientras que la presencia de uno o más dobles enlaces en *cis* interfiere en el empaquetamiento dando lugar a una estructura menos ordenada (**D**).

Los ácidos grasos son compuestos naturales que podemos encontrarlos tanto en animales como en vegetales. Aquellos que son necesarios para el organismo, pero que éste no los puede sintetizar en las cantidades necesarias, se denominan ácidos grasos esenciales y deben ser incorporados mediante la dieta. Algunos ejemplos son el ácido linoléico, el linolénico o el araquidónico.

Como se ha mencionado anteriormente, los ácidos grasos en sus formas aniónicas presentan una estructura adecuada para ser utilizados como modificadores de LDHs y dar lugar a organo-LDHs que, por sus propiedades hidrofóbicas, puedan utilizarse en diferentes aplicaciones medioambientales como adsorbentes de compuestos orgánicos. A diferencia de lo que ocurre con otros surfactantes aniónicos que se han venido utilizando para la preparación de organo-LDHs, como los alquil-sulfatos o los alquil-sulfonatos, el hecho de que los ácidos grasos sean compuestos naturales representa la ventaja añadida de que el adsorbente resultante de su incorporación en LDHs produzca un mínimo impacto en el medio natural en sus posibles aplicaciones medioambientales.

La mayoría de estudios realizados hasta ahora con organo-LDHs preparados a partir de ácidos grasos se han limitado principalmente a la caracterización estructural de dichos compuestos, siendo los ácidos grasos

saturados los más utilizados y habiéndose prestado muy poca atención a la caracterización estructural de organo-LDHs preparados a partir de ácidos grasos insaturados (Borja y Dutta, 1992; Kameshima et al., 2006; Ayala-Luis et al., 2010).\_Existe además muy poca información sobre la capacidad adsorbente de organo-LDHs preparados a partir de ácidos grasos para compuestos orgánicos en general y para plaguicidas en particular.

Teniendo en cuenta la escasa información existente al respecto, el principal objetivo del presente capítulo ha sido sintetizar y caracterizar varios organo-LDHs utilizando ácidos grasos insaturados como aniones modificadores, evaluar su capacidad de adsorber pesticidas de distinta naturaleza química y proponer algunas aplicaciones de dichos materiales como adsorbentes de los pesticidas con el fin de aumentar su eficacia y reducir su impacto ambiental.

**IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS****IV.2.1. MATERIALES****IV.2.1.1. Hidrotalcita de partida**

Para la preparación de los organo-LDHs se utilizó como material de partida una hidrotalcita de Mg:Al (3:1) con carbonato como anión interlamilar, que se preparó en el laboratorio siguiendo el procedimiento que se describirá en el apartado IV.2.2.1.

En la Tabla IV.1 se detallan los reactivos utilizados para la síntesis de la hidrotalcita, los cuales fueron suministrados por Sigma Aldrich.

Tabla IV.1. Reactivos utilizados para la síntesis de la hidrotalcita de partida.

Compuesto	Fórmula	PM (g/mol)	Pureza (%)
Nitrato de aluminio nonahidratado	$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	375.1	$\geq 98$
Nitrato de magnesio hexahidratado	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	256.4	$\geq 98$
Carbonato sódico	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	106.0	$\geq 99$
Hidróxido sódico	$\text{NaOH}$	40.0	$\geq 98$

**IV.2.1.2. Aniones orgánicos utilizados para la obtención de las organohidrotalcitas**

En la Tabla IV.2 se muestran los distintos ácidos orgánicos modificadores utilizados para la preparación de las organohidrotalcitas, junto con algunas de sus características físico-químicas. En la tabla aparece la sal sódica del anión dodecilsulfato (DDS), que lo utilizamos como anión de referencia, debido a la existencia de una amplia bibliografía donde se describe la estructura y propiedades adsorbentes de LDHs intercalados con este anión modificador.

Los ácidos grasos se seleccionaron por poseer el mismo número de átomos de carbono (C18) en la cadena alquílica lineal (Tabla IV.2), y diferenciarse en el número y/o configuración de los dobles enlaces que poseen. Las estructuras químicas de los ácidos se muestran en la Fig. IV.5, donde se puede apreciar cómo los dobles enlaces en configuración *cis* provocan una curvatura de las cadenas hidrocarbonadas.



#### Capítulo IV. Sistema hidrotalcita-ácidos grasos insaturados

Tabla IV.2. Algunas características físico-químicas de los ácidos grasos utilizados para la preparación de las organohidrotalcitas y del dodecilsulfato sódico, usado como referencia.

Ácidos	Fórmula Molecular	Masa Molecular (g/mol)	Estado Físico	Nomenclatura IUPAC
Elaídico	$C_{18}H_{34}O_2$	282.5	Sólido Blanco	Ácido <i>trans</i> -9-octadecenoico
Oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	282.5	Líquido incoloro	Ácido <i>cis</i> -9-octadecenoico
Linoléico	$C_{18}H_{32}O_2$	280.4	Líquido amarillo claro	Ácido <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-octadecadienoico
$\alpha$ -Linolénico	$C_{18}H_{30}O_2$	278.4	Líquido	Ácido <i>cis</i> , <i>cis</i> , <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico
DDS	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	288.4	Sólido Blanco	Dodecilsulfato sódico

El ácido **elaídico** (ELA) es el isómero *trans* del ácido oleico. Se forma con frecuencia como subproducto en el proceso de hidrogenación de ácidos grasos insaturados.

El ácido **oleico** (OLE) es un ácido graso monoinsaturado, con un doble enlace en *cis* en la posición 9, que abunda en los aceites vegetales como el aceite de oliva, constituido en un 55-80% por dicho ácido.

El ácido **linoléico** (LINO) es un ácido graso esencial para el organismo humano; el organismo no puede sintetizarlo y tiene que ser incorporado mediante la dieta. Es un ácido graso poliinsaturado, con dos dobles enlaces en *cis* en los carbonos 9 y 12.

El ácido  **$\alpha$ -linolénico** (LINOLEN) es un ácido graso poliinsaturado, también esencial, con 3 dobles enlaces en *cis* en las posiciones 9, 12 y 15.

La **sal dodecilsulfato sódico** (DDS) es un tensioactivo aniónico que posee una cadena de 12 átomos de carbono unida a un grupo sulfato, lo que dota a la molécula de propiedades anfifílicas. Se utiliza como componente en diversos productos de higiene personal como pasta de dientes, champú y jabones de baño.

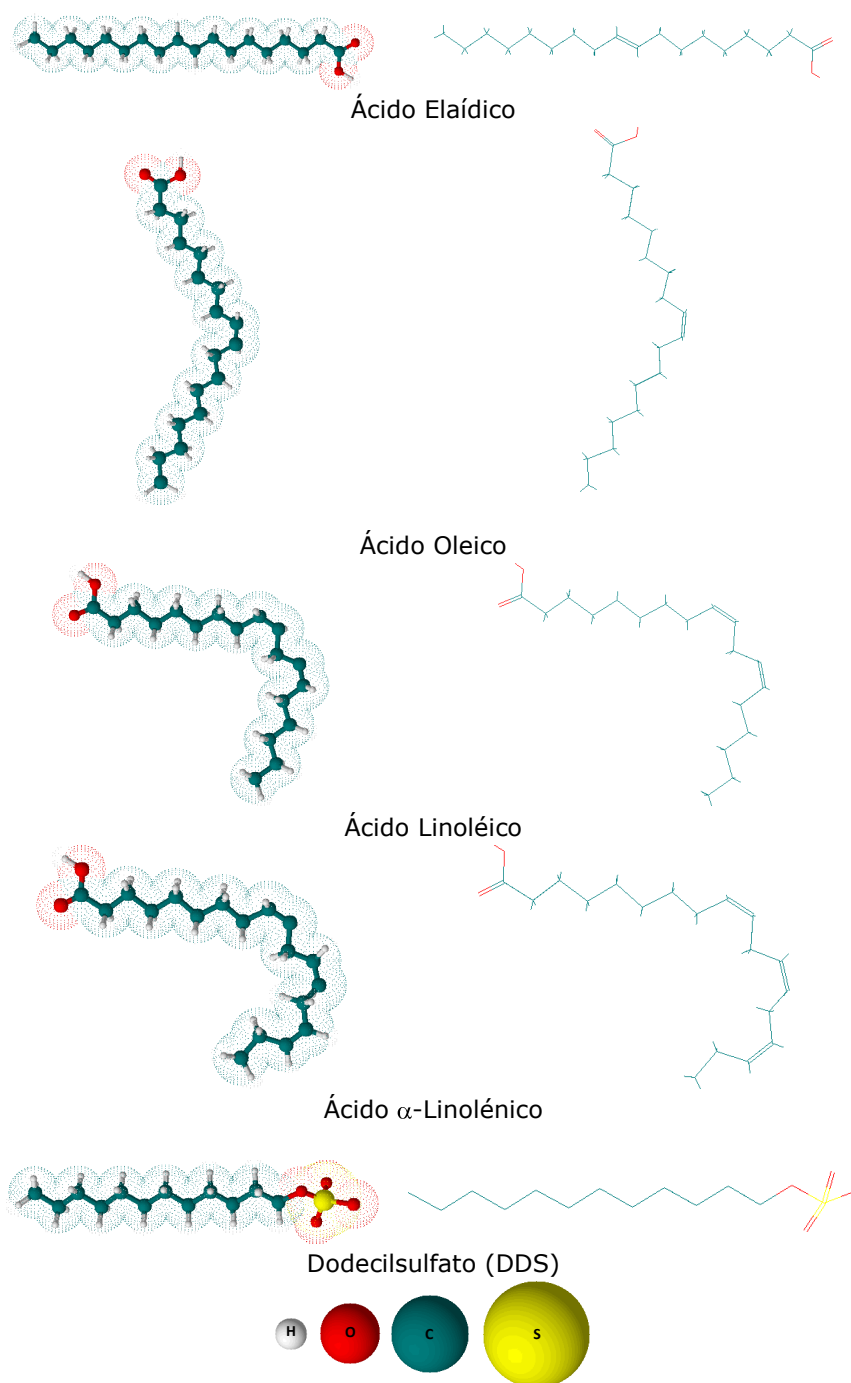


Fig. IV.5. Estructura química de los ácidos grasos y del DDS

### IV.2.1.3. Plaguicidas

Para el estudio de las propiedades adsorbentes de las organohidrotalcitas se han utilizado los mismos plaguicidas seleccionados en el capítulo anterior: clopiralida, imazetapir, atrazina, terbutilazina, diurón, alacloro y metalaxil. En el apartado III.2.1.2 de esta memoria se describen las principales características físico-químicas de estos plaguicidas. Los plaguicidas presentan distintas características de carga y grupos funcionales y solubilidades diversas, para de esta manera intentar relacionar dichas características estructurales con su posible afinidad por las organohidrotalcitas preparadas.

### IV.2.1.4. Suelos

Además de los dos suelos descritos en el capítulo anterior (suelos 1 y 2), algunos experimentos de este capítulo se realizaron con dos suelos agrícolas adicionales (suelos 3 y 4) procedentes de la provincia de Sevilla. Las características de todos los suelos se comparan en la Tabla IV.3. El suelo 3 se empleó en experimentos de adsorción y lixiviación, mientras que el suelo 4 se utilizó para realizar estudios de mineralización, debido a que era el suelo disponible en el laboratorio donde se realizó una estancia breve durante la que se realizaron dichos estudios.

Tabla IV.3. Características de los suelos utilizados.

	Clase textural	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	pH	C.O (%)
Suelo 1	Franco arenoso	56	33	11	4.5	5.5
Suelo 2	Franco arcillo arenoso	63	16	21	8.0	1.4
Suelo 3	Arenoso	92	4	3	8.6	0.2
Suelo 4	Franco arenoso	71	9	20	8.1	1.1

## IV.2.2. MÉTODOS

### IV.2.2.1. Síntesis de la hidrotalcita de partida y de su producto de calcinación

La hidrotalcita de partida ( $\text{HTCO}_3$ ) utilizada para la preparación de las organohidrotalcitas fue una hidrotalcita  $\text{Mg}:\text{Al}$  del tipo 3:1, con  $\text{CO}_3^{2-}$  como anión interlamilar y de fórmula ideal  $\text{Mg}_3\text{Al}(\text{OH})_8(\text{CO}_3)_{0.5}\cdot n\text{H}_2\text{O}$ . Se preparó por coprecipitación y en la Fig. IV.6 se muestra una imagen del montaje diseñado para su síntesis.



Fig. IV.6. Imagen del montaje para el proceso de síntesis de la muestra  $\text{HTCO}_3$

En primer lugar, se prepararon 100 ml de una disolución acuosa que contenía 0.3 moles de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 0.1 moles de  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , es decir, los metales estructurales del LDH en una relación 3:1 ( $\text{Mg}:\text{Al}$ ). Esta disolución se colocó en un embudo de decantación y se añadió gota a gota a un matraz de fondo redondo que contenía 500 ml de una disolución acuosa con 1.6 moles de  $\text{NaOH}$  y 0.37 moles de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en constante agitación. En la Fig. IV.7 se muestra cómo comienza a precipitar el hidróxido doble laminar en el matraz de fondo redondo tras añadir las primeras gotas de la disolución con los metales.

Tras la completa coprecipitación de los metales, la suspensión obtenida se sometió a un tratamiento hidrotermal a 80-90 °C durante 24 h, utilizando para ello reactores de teflón recubiertos de acero, con una capacidad de 200 ml y cerrados herméticamente. Tras el tratamiento hidrotermal, el contenido de los reactores se dividió en 4 porciones iguales de unos 150 ml cada una que se añadieron a tubos de centrifuga de 250 ml de capacidad y se centrifugaron a 10000 rpm. Los sólidos resultantes se lavaron 5 veces con 150 ml de agua

destilada, para finalmente ser liofilizados, mezclados y conservados en un desecador hasta su posterior uso.

Una porción de la hidrotalcita obtenida se colocó en un crisol de cerámica y se calcinó en una mufla (Orbesal MOD 12. PR/300 serie 8B) a una temperatura de 550 °C durante 3 horas para obtener el óxido mixto amorfo ( $HT_{500}$ ), de fórmula ideal  $Mg_6Al_2O_9$ , que se utilizaría posteriormente para sintetizar las organohidrotalcitas por el procedimiento de reconstrucción. Para evitar la rehidratación del óxido mixto, éste se conservó en un vial cerrado herméticamente en el interior de un desecador y fue usado poco después de su obtención.

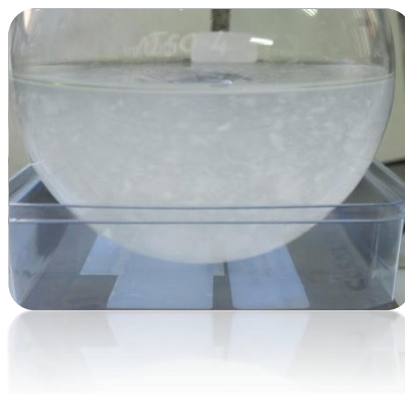


Fig. IV.7. Detalle de la síntesis de la hidrotalcita de partida ( $HTCO_3$ )

### IV.2.2.2. Síntesis de las organohidrotalcitas

La síntesis de todas las organohidrotalcitas se realizó utilizando el método de reconstrucción a partir del producto calcinado (Chibwe y Jones, 1989; Cavani et al., 1991; Pavlovic et al., 1997). En la Tabla IV.4 se resume la nomenclatura de las diferentes muestras preparadas y las condiciones utilizadas para la síntesis.

Para la preparación de las organohidrotalcitas con ELA, OLE, LINO y LINOLEN como aniones modificadores, se añadieron 0.5 g de la muestra de hidrotalcita calcinada ( $HT_{500}$ ) a 110 ml de una disolución acuosa que contenía 3 mmol del ácido graso y 3.3 mmol de NaOH, esta última añadida para asegurar la presencia del ácido graso en su forma aniónica. La cantidad de ácido utilizada (3 mmol) correspondió a los mmoles de Al existentes en los 0.5 g de  $HT_{500}$  (asumiendo la fórmula  $Mg_6Al_2O_9$ ) y, por tanto, a la cantidad necesaria para compensar la carga laminar esperada de la hidrotalcita, una vez reconstruida.

Para facilitar la disolución de los ácidos se aumentó la temperatura de la disolución a unos 60 °C, se agitó durante unos minutos y se mantuvo dicha temperatura durante la reacción de reconstrucción.

Transcurridas aproximadamente 24 h, las suspensiones se centrifugaron y los sólidos se lavaron dos veces con 100 ml de agua Milli-Q a 60 °C. Los sobrenadantes de los lavados se guardaron para posteriormente ser filtrados al vacío y minimizar así las pérdidas de producto durante los ciclos de filtración y lavado. Las muestras obtenidas, tanto en los filtros como en los tubos de centrífuga, se secaron en estufa a 60 °C y, una vez secas, se homogeneizaron en un mortero de ágata y se guardaron a temperatura ambiente en un vial de vidrio cerrado herméticamente y en la oscuridad hasta su uso posterior.

Tabla IV.4. Nomenclatura y condiciones de síntesis de las organohidrotalcitas<sup>a</sup>

Nomenclatura	Base inorgánica (0.5 g)	Disolución con el anión modificador (110 ml de disolución acuosa)	T (°C)
HT-ELA	HT <sub>500</sub>	ELA (3 mmol) + NaOH (3.3 mmol)	60
HT-OLE	HT <sub>500</sub>	OLE (3 mmol) + NaOH (3.3 mmol)	60
HT-LINO	HT <sub>500</sub>	LINO (3 mmol) + NaOH (3.3 mmol)	60
HT-LINOLEN	HT <sub>500</sub>	LINOLEN (3 mmol) + NaOH (3.3 mmol)	60
HT-DDS	HT <sub>500</sub>	DDS (3 mmol) + NaOH ( <b>0.3 mmol</b> )	60

<sup>a</sup> ELA: ácido elaídico; OLE: ácido oleico; LINO: ácido linoléico; LINOLEN: ácido  $\alpha$ -linolénico; DDS: dodecilsulfato sódico

Para la preparación de la organohidrotalcita con DDS como anión modificador no fue necesario añadir la cantidad de sosa equivalente para su ionización, ya que se usó la sal sódica del DDS, siguiendo por lo demás la misma metodología utilizada para la preparación de las organohidrotalcitas con los ácidos grasos, respetando las concentraciones y la temperatura del procedimiento.

Por último, mencionar que, con fines comparativos, también se sintetizó una muestra control o blanco añadiendo 0.5 g de HT<sub>500</sub> a 110 ml de una disolución acuosa que sólo contenía 0.3 mmol de NaOH, en ausencia de anión orgánico modificador alguno, siguiendo, por lo demás, el mismo procedimiento descrito anteriormente para la preparación de las organohidrotalcitas.

#### **IV.2.2.3. Caracterización de las organohidrotalcitas**

Las organohidrotalcitas preparadas se caracterizaron siguiendo las técnicas de análisis elemental, difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido y de transmisión, espectroscopia de infrarrojos con transformada de

Fourier y medidas de potencial Z. Los procedimientos se describen brevemente a continuación.

Análisis Elemental: Se realizó mediante espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (Espectrofotómetro ICP-OES Varian ICP 720-ES de configuración axial), en el cual se determinaron los contenidos en Mg y Al de las muestras previa disolución de las mismas (20 mg) con HCl al 37% (1 ml). Además se determinó el contenido de C y N en las muestras sólidas, utilizándose un analizador Perkin-Elmer, modelo 1106. Por otra parte, con el fin de determinar la estabilidad de las organohidrotalcitas en suspensión acuosa de las mismas, se determinó el carbono orgánico total (TOC) en disolución liberado por las muestras tras agitar 20 mg de cada una de ellas en 10 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M durante 24 h y filtrar las suspensiones con un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Dichos análisis de carbono orgánico disuelto se llevaron a cabo en un analizador de Carbono Orgánico Total con módulo de Nitrógeno Shimadzu TOC-V sch.

Difracción de Rayos X: Los análisis se realizaron directamente con las muestras sólidas en forma de polvo sobre el portamuestras. Se utilizaron dos tipos de difractómetros distintos, por la posibilidad de obtener una mayor resolución para ángulos bajos en uno de ellos. El primero que se utilizó fue un difractómetro Siemens D-5000 con radiación  $\text{CuK}\alpha$ ; las condiciones de operación fueron un voltaje de 40 kV, una intensidad de 30 mA, velocidad de barrido 2 °/min y paso de 0.02° en unidades de 2 $\theta$ . El segundo difractómetro utilizado fue el modelo D8 DISCOVER de la marca BRUKER, con el que, bajo las mismas condiciones de operación, se consiguió una mayor resolución a ángulos bajos.

Microscopía Electrónica: La morfología de las organohidrotalcitas sintetizadas se estudió obteniendo imágenes de microscopía electrónica, utilizándose un microscopio electrónico de barrido Hitachi S5200 (SEM) y un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H800 (TEM). Las muestras en forma de polvo se recubrieron de una capa de oro para inmovilizarlas antes de visualizarlas en por SEM, mientras que para el análisis por TEM la muestra se dispersó sobre una gradilla de grafito utilizando agua como dispersante.

Espectroscopia Infrarroja: Para los estudios por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) se utilizó un espectrómetro Jasco FT / IR 6300 (Jasco Europa srl) colocando directamente las muestras sólidas en un portamuestras horizontal de reflectancia total atenuada (ATR). El barrido se realizó en el intervalo entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando un promedio de 32 registros para mejorar la relación señal:ruido. A los espectros obtenidos se les restó el de un blanco sobre la celda vacía para salvar las interferencias producidas por el  $\text{CO}_2$  y vapor de agua atmosféricos.

Potencial Z: se midió usando un equipo Zetasizer Nano ZS (Fig. III.3), utilizando suspensiones en agua de las muestras de 0.14 mg/ml.

**IV.2.2.4. Evaluación preliminar de las organohidrotalcitas como adsorbentes de plaguicidas**

Se tomaron muestras de todas las organohidrotalcitas (Tabla IV.4) para realizar estudios preliminares de adsorción de los plaguicidas seleccionados, con el fin de relacionar la magnitud del proceso de adsorción con las características de las organohidrotalcitas y de los plaguicidas.

Los experimentos de adsorción se realizaron por triplicado utilizando tubos pyrex de vidrio con tapones de rosca, en los que se pesaron 20 mg de adsorbente y a los que se les añadió 8 ml de una disolución acuosa de 1 mg/l de plaguicida a un  $\text{pH} \approx 7$ . Las muestras se agitaron durante 24 h a una temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , se centrifugaron y se midió la concentración del plaguicida en la disolución de equilibrio, bien por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), bien por centelleo líquido, según se describe en el apartado III.2.2.3 del capítulo anterior. También se prepararon disoluciones iniciales de plaguicida sin adsorbente que sirvieron como controles para descartar posibles pérdidas del plaguicida debido a otros procesos diferentes al de adsorción a los sólidos.

La cantidad de plaguicida adsorbido ( $C_s$ ) en los experimentos de adsorción se obtuvo, como se describe en el capítulo anterior, usando la siguiente ecuación:

$$C_s = [(C_{\text{ini}} - C_e) / M] \times V$$

donde:

$C_s$ : cantidad adsorbida de plaguicida (mg/kg)

$C_{\text{ini}}$ : concentración inicial del plaguicida (mg/l)

$C_e$ : concentración de plaguicida en la disolución de equilibrio (mg/l)

$M$ : masa del adsorbente (kg)

$V$ : volumen de la disolución (l)

Los porcentajes de plaguicida adsorbido, % Ads, a la concentración inicial utilizada se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Ads} = [(C_{\text{ini}} - C_e) / C_{\text{ini}}] \times 100,$$



mientras que los coeficientes de distribución  $K_d$  (l/kg) se calcularon como:

$$K_d = C_s / C_e$$

### IV.2.2.5. Biodisponibilidad

Los estudios de biodisponibilidad se llevaron a cabo con el herbicida atrazina por disponer de bacterias capaces de mineralizar este compuesto. En los experimentos donde la biodisponibilidad se midió en presencia de suelo, se utilizó el suelo 4, cuyas características se dan en la Tabla IV.3. Las medidas se realizaron durante una estancia breve realizada en el Department of Soil, Water and Climate de la Universidad de Minnesota (EE.UU.) y su finalidad fue evaluar el efecto de la adsorción a las organohidrotalcitas en la disponibilidad del herbicida frente a bacterias adaptadas a su mineralización.

Se realizaron dos tipos de experimentos de biodisponibilidad: en disolución acuosa y en suspensiones de suelo, en ambos casos en presencia y ausencia de las organohidrotalcitas. En el primer caso, se pesaron 40 mg de los adsorbentes y se les añadió 8 ml de una disolución acuosa de atrazina marcada con  $C^{14}$  y, posteriormente, 1 ml de *Pseudomonas* sp., cepa ADP, equivalente a una concentración de  $1 \times 10^8$  microorganismos  $g^{-1}$  de suelo (Cabrera et al., 2008; Trigo et al., 2010). La suspensión se colocó en un matraz biométrico (Fig. IV.8) y en el brazo de dicho matraz se colocó un vial con 3 ml de NaOH, dejando el matraz en oscuridad y a una temperatura de 19 °C. El segundo experimento se realizó pesando 0.4 g de suelo 4 al cual se le añadió 40 mg de adsorbente con 0.5 ml de disolución acuosa de atrazina marcada con  $C^{14}$  y 1 ml de *Pseudomonas* sp., cepa ADP. La metodología y condiciones fueron las mismas que en el caso anterior.

Diariamente el vial de NaOH era reemplazado por otro nuevo, se tomaba una alícuota de 1 ml de la disolución de NaOH, se mezclaba con 3 ml de cocktail de centelleo y al día siguiente se medía su radioactividad por centelleo líquido. De esta manera se obtuvo el porcentaje de herbicida mineralizado a  $^{14}CO_2$  por las bacterias en función del tiempo de incubación.



Fig. IV.8. Imagen de los matraces biométricos utilizados para los experimentos de mineralización

#### IV.2.2.6. Evaluación adicional de posibles aplicaciones de los adsorbentes para el fungicida metalaxil

Tras los resultados obtenidos en los estudios preliminares de adsorción, se decidió seleccionar el fungicida metalaxil como ejemplo de plaguicida por el que las organohidrotalcitas presentaron una alta afinidad. Los experimentos que se plantearon estuvieron dirigidos a profundizar en el estudio de la adsorción-desorción de este plaguicida y a ilustrar algunas posibles aplicaciones de las organohidrotalcitas como adsorbentes. A continuación se describen los distintos experimentos realizados.

##### IV.2.2.6.1. Estudios de adsorción-desorción a los adsorbentes

La metodología seguida para profundizar en el proceso de adsorción-desorción del fungicida metalaxil a las organohidrotalcitas fue la siguiente:

- a) **Estudio de la estabilidad del metalaxil en función del pH:** Se prepararon disoluciones acuosas de metalaxil a una concentración inicial de 1 mg/l y distintos pH que variaron entre 10 y 13. Se colocaron 8 ml de las disoluciones de metalaxil a los distintos pH en tubos pyrex de vidrio con tapones de rosca, tras lo cual se agitaron durante 24 h a  $20 \pm 2$  °C. A continuación, se centrifugaron, filtraron y analizaron por HPLC para determinar la concentración de fungicida en disolución. Se siguió, por tanto, una metodología similar a la de los estudios de adsorción pero sin adsorbente con el fin de distinguir si se podría dar degradación del fungicida en disolución acuosa a los pH que daban los adsorbentes en las suspensiones.
- b) **Cinéticas de adsorción:** El estudio cinético se llevó a cabo con las muestras HT<sub>500</sub>, HT-ELA y HT-OLE a una concentración inicial de

fungicida de 1 mg/l. Se pesaron 20 mg del adsorbente y se les adicionó una disolución acuosa de metalaxil de 1 mg/l. Las muestras se agitaron durante 1, 3, 6, 9, 24, 48, 72 h y, transcurrido el tiempo especificado, se centrifugaron los tubos y los sobrenadantes se filtraron y se analizaron por HPLC. Así se determinó la concentración de fungicida en disolución y la cinética de adsorción a los sólidos a partir de las cantidades adsorbidas a distintos tiempos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

- c) **Isotermas de adsorción:** El estudio de la adsorción a diferentes concentraciones iniciales de fungicida se llevó a cabo con las muestras  $\text{HTCO}_3$ , HT-ELA y HT-OLE. Se pesaron 20 mg de los adsorbentes por duplicado y se pusieron en contacto con una disolución acuosa de metalaxil a diferentes concentraciones iniciales ( $C_{\text{inic}} = 0.1, 0.2, 1, 2, 20, 200$  y  $600$  mg/l). Tras agitar durante 24 h a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C, las suspensiones se centrifugaron y se retiraron 4 ml de sobrenadante, que se filtraron y se analizaron por HPLC.
- d) **Desorción:** El estudio de desorción se llevó a cabo utilizando tres tipos de extractantes (agua, metanol y HCl 37%) y a dos concentraciones iniciales de plaguicida ( $C_{\text{ini}} = 1$  y  $600$  mg/l). Tras medir la adsorción a estas concentraciones iniciales, se retiraron 6 ml de sobrenadante y se sustituyeron por 6 ml de agua, 6 ml de metanol o 1 ml de HCl al 37% más 5 ml de agua. Los tubos se volvieron a resuspender, se agitaron a  $20 \pm 2$  °C durante 2 h, se centrifugaron y se retiraron 6 ml de sobrenadante para ser filtrados y analizados por HPLC. En el caso de las desorciones con agua y metanol, este proceso se realizó tres veces consecutivas.

### IV.2.2.6.2. Estudios de adsorción en suspensiones suelo:agua

Este estudio tuvo como objetivo determinar la posible utilidad de las organohidrotalcitas como enmendantes de suelos para aumentar su capacidad de retención del fungicida y reducir la posible dispersión de éste en el medio ambiente hacia zonas alejadas del lugar de aplicación, o minimizar una posible contaminación por el fungicida estudiado debido, por ejemplo, a un derrame casual o a un sitio de lavado de mochilas u otro material de aplicación o preparación en campo.

Las organohidrotalcitas seleccionadas para realizar este estudio fueron HT-ELA y HT-OLE, por mostrar mayor afinidad por el metalaxil, determinándose el efecto de su adición a los suelos 1, 2 y 3 en la adsorción del fungicida.

Se pesaron, por duplicado, 0.5 g de los suelos seleccionados, enmendándolos con las organohidrotalcitas a diferentes porcentajes (0%, 5%, y 10%) y posteriormente adicionándoles 8 ml de una disolución acuosa de 1 mg/l de metalaxil. Las suspensiones se agitaron durante 24 h a una temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , para posteriormente centrifugarlas y tomar alícuotas de 4 ml del sobrenadante, que se filtraron y analizaron por HPLC.

La cantidad de metalaxil adsorbida ( $C_s$ ) a los suelos sin enmendar y enmendados con las organohidrotalcitas se determinó a partir de la diferencia entre la concentración de fungicida inicial ( $C_{ini}$ ) y la concentración de equilibrio ( $C_e$ ).

Los porcentajes de adsorción de metalaxil (% Ads) y los coeficientes de distribución ( $K_d$ ) se calcularon también como se describe en los apartados III.2.2.3 y IV.2.2.4.

### **IV.2.2.6.3. Evaluación de las organohidrotalcitas como soportes para la preparación de formulaciones de liberación lenta de metalaxil**

Con aquellas organohidrotalcitas que presentaron mejores propiedades adsorbentes en las pruebas de adsorción-desorción (HT-ELA y HT-OLE), se prepararon complejos de liberación lenta o controlada de metalaxil. Posteriormente, dichos complejos se utilizaron para realizar estudios de liberación en medio acuoso y movilidad en columnas de suelo. Se describe a continuación la preparación, caracterización y estudio de la liberación en agua y lixiviación en suelo de estas formulaciones.

#### **IV.2.2.6.3.1. Preparación de las formulaciones**

En primer lugar se pesaron 200 mg de los adsorbentes elegidos (HT-ELA y HT-OLE) y se pusieron en contacto con una disolución acuosa de metalaxil con una concentración de 600 mg/l. La suspensión se agitó durante 24 h, seguidamente se centrifugó y el sobrenadante obtenido se filtró al vacío, dejando el sólido resultante (complejo adsorbente-fungicida) secar al aire. El líquido obtenido tras el filtrado se analizó por HPLC para determinar la concentración de fungicida en la disolución y estimar, por diferencia, la cantidad retenida por los sólidos.

#### **IV.2.2.6.3.2. Contenido de fungicida en las formulaciones**

La cantidad de metalaxil en las formulaciones se calculó de dos formas:

- a) Cálculo indirecto: Se calculó por diferencia entre la concentración inicial y la del líquido obtenido tras el filtrado, medidas ambas por HPLC.
- b) Cálculo directo: Se pesaron 5 mg de cada complejo adsorbente-fungicida y se pusieron en contacto con 10 ml de metanol. La suspensión se agitó durante 24 h, los sobrenadantes se filtraron y se analizaron por HPLC y, de esta manera, se obtuvo directamente la cantidad de fungicida presente en los complejos.

### IV.2.2.6.3.3. Experimentos de lixiviación

Los estudios de lixiviación se realizaron usando columnas de vidrio empaquetadas a mano de 30 cm de longitud y 3 cm de diámetro interno (Fig. IV.9).



Fig. IV.9. Imagen de las columnas empaquetadas a mano durante los experimentos de lixiviación de metalaxil

En la parte inferior de las columnas se puso una pequeña cantidad de lana de vidrio y 10 g de arena de mar de grano grueso. A continuación, las columnas se rellenaron con los suelos 1 ó 3 (Tabla IV.3) en fracciones de 5 cm hasta completar un total de 20 cm de altura. Se utilizaron aproximadamente 130 g del suelo 1 y 200 g del suelo 3. A la parte superior de la columna se le añadieron 10 g más de arena de mar, para evitar la formación de canales de flujo preferencial y homogeneizar la distribución del fungicida y del agua durante su aplicación.

Una vez empaquetadas, las columnas se saturaron con 100 ml de agua destilada, se dejaron drenar durante 24 h y se midió el volumen de agua percolada. A partir de la diferencia entre el volumen de agua adicionada y el recogido se calculó el volumen de poros de las columnas, que fue de  $70 \pm 1$  ml para el suelo 1 y  $57 \pm 1$  ml para el suelo 3.

El fungicida metalaxil se aplicó a las columnas como disolución acuosa y como organohidrotalcitas HT-ELA y HT-OLE con el plaguicida integrado. La aplicación de las formulaciones organohidrotalcita-metalaxil se llevó a cabo bien en la parte superior de la columna (en superficie), bien enterrándolas bajo 1 cm adicional de suelo, tal como se muestra esquemáticamente en la Fig. IV.10. La dosis de metalaxil recomendada, según los usos, varía entre 0.5 y 5 kg/ha y para el experimento se utilizó 2 kg/ha.

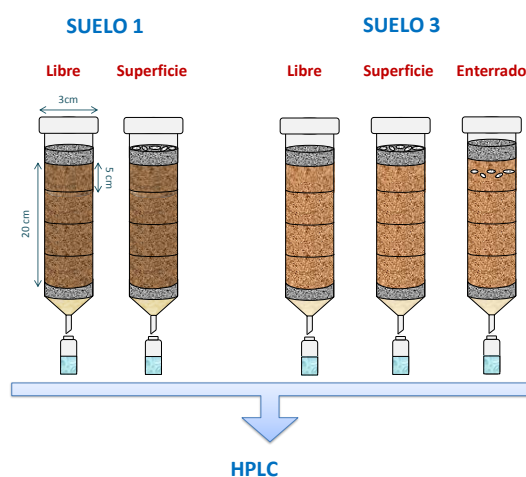


Fig. IV.10. Esquema de las columnas de suelo

Todos los días se les adicionaba a las columnas 15 ml de agua destilada y, tras 24 h, se recogían los lixiviados para posteriormente filtrarlos y analizarlos por HPLC.

Una vez finalizado el experimento de lixiviación, las columnas se dividieron en 4 secciones de 5 cm, correspondiendo a las diferentes profundidades (0-5, 5-10, 10-15, 15-20 cm) de la misma. Para determinar la cantidad de fungicida retenido en los suelos, se realizó una extracción con metanol. Cada anillo de suelo se puso en agitación durante 24 h con 100 ml del extractante. Las muestras se centrifugaron, se tomaron alícuotas de los distintos extractos, se filtraron y posteriormente se analizaron por HPLC con una columna C18 (ver apartado III.2.2.3 del capítulo anterior). El estudio de lixiviación se realizó por triplicado.

El metalaxil es un compuesto quiral (Fig. IV.11), formado por una mezcla al 50% del enantiómero *R*-Metalaxil y el *S*-Metalaxil. A pesar de que las propiedades fisicoquímicas de los dos enantiómeros son prácticamente idénticas, la actividad biológica es mucho mayor para el enantiómero *R* que para el *S* y los procesos biodegradativos también pueden afectar a uno de los enantiómeros en mayor medida que al otro (Buerge et al., 2003). Esto es consecuencia de que muchos procesos biológicos implican estructuras con centros quirales, tales como enzimas, por lo que son enantioselectivos. Por ello, se decidió completar el estudio de lixiviación del fungicida analizando separadamente en los lixiviados la cantidad de cada uno de los enantiómeros del fungicida: *S*-metalaxil y *R*-metalaxil. Para ello, se utilizó una columna quiral (Chiralpak IB de 150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno), con un flujo de 1 ml/min fase móvil (60% H<sub>2</sub>O:40% Acetonitrilo), con una longitud de onda de detección de 213 nm, un tiempo de análisis de 8 min y un volumen de inyección de muestra de 50 µl, que permitió separar los enantiómeros de *S*- y *R*-metalaxil, saliendo éstos a tiempos de 4.9 y 6.1 minutos, respectivamente (Fig. IV.12).

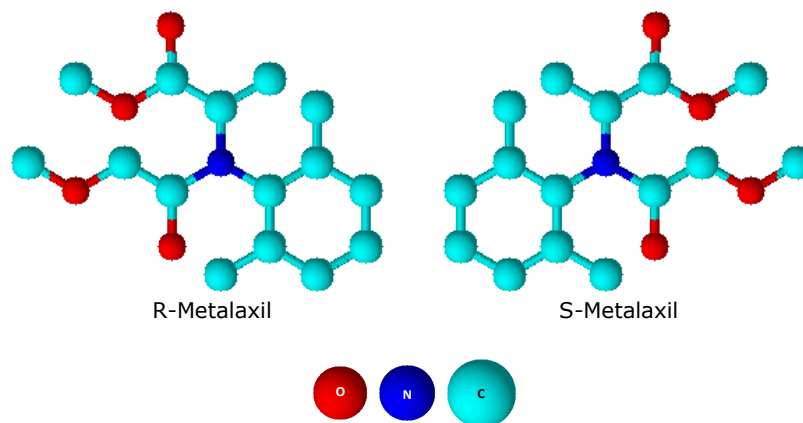


Fig. IV.11. Estructura de los enantiómeros de la molécula metalaxil

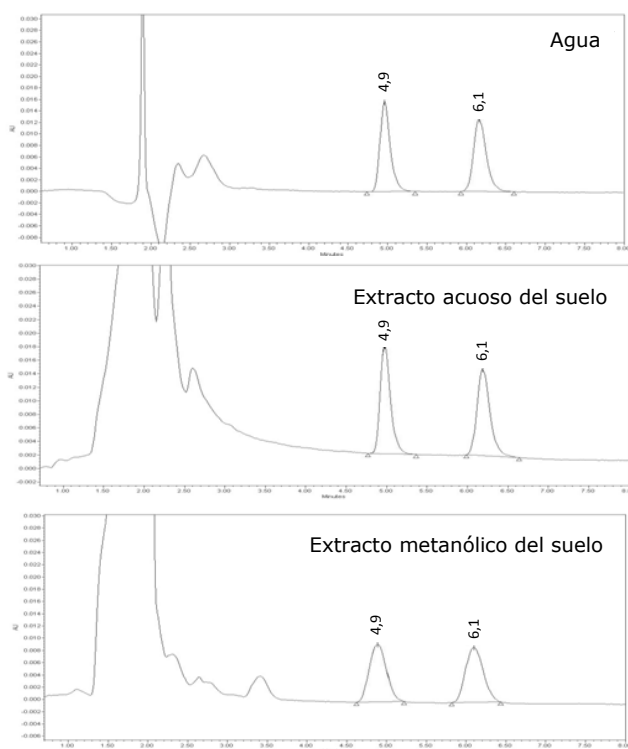


Fig. IV.12. Ejemplos de cromatogramas representativos de una disolución racémica de 2 mg/l de metalaxil, preparada en agua y en extractos acuoso y metanólico del suelo. Los extractos de suelo se prepararon por agitación de 50 g de suelo 2 con 100 ml de agua o metanol. El pico a 4.9 min corresponde a *S*-metalaxil mientras que el pico a 6.1 min corresponde a *R*-metalaxil.

Por otra parte, con el fin de determinar posibles cambios en los patrones de lixiviación del fungicida, tanto libre como soportado, tras aplicaciones repetidas del producto a un mismo suelo, se obtuvieron los perfiles de lixiviación del fungicida libre (disolución acuosa) y de las formulaciones de liberación lenta (organohidrotalcita-metalaxil) no sólo tras una primera aplicación sino tras otras dos aplicaciones consecutivas a las columnas de suelo.



### IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### IV.3.1. Caracterización de las muestras

##### IV.3.1.1. Análisis elemental

En la Tabla IV.5 se presentan los resultados del análisis elemental de las organohidrotalcitas preparadas en este trabajo junto con los del análisis de los minerales de partida  $\text{HTCO}_3$  y  $\text{HT}_{500}$ .

Considerando la fórmula general de los compuestos tipo hidrotalcita como:  $[M_{1-x}^{II} M_x^{III} (\text{OH})_2]^{x+} [A^{n-}]_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}$ , la relación de los metales seguirá la siguiente expresión:

$$\frac{M^{II}}{M^{III}} = \frac{(1-x)}{x}$$

De esta forma a partir de la relación  $M^{II} / M^{III}$  se puede calcular el parámetro  $x$  de la fórmula, que refleja la fracción de catión trivalente en el mineral:

$$x = \frac{M^{III}}{M^{II} + M^{III}}$$

Para todas las muestras el valor de  $x$  se aproxima a  $x = 0.25$ , que coincide con la fracción de catión trivalente en la disolución de síntesis, lo que indica que los metales precipitaron completamente durante la preparación de la hidrotalcita de partida (Tabla IV.5).

Tabla IV.5. Porcentaje de los elementos analizados y relaciones atómicas de las distintas muestras.

Muestras	Masa (%)					Relaciones atómicas			
	Mg	Al	C	N	S	x	Mg/Al	C/Al	Anión/Al
$\text{HTCO}_3$	23.3	8.2	2.2	<0.05	<0.05	0.24	3.1	0.6	0.61
$\text{HT}_{500}$	40.2	13.9	0.8	<0.05	<0.05	0.24	3.2	0.1	0.13
HT-ELA	12.8	4.5	39.0	<0.05	<0.05	0.24	3.2	19.5	1.08
HT-OLE	12.3	4.4	38.4	<0.05	<0.05	0.24	3.1	19.9	1.10
HT-LINO	12.4	4.3	38.0	<0.05	<0.05	0.24	3.2	19.9	1.10
HT-LINOLEN	12.0	4.1	37.6	<0.05	<0.05	0.24	3.2	20.4	1.13
HT-DDS	13.7	4.8	24.1	<0.05	4.99	0.24	3.2	11.3	0.95

El valor de  $x$  indica la carga laminar originada por la incorporación del catión trivalente, en nuestro caso  $Al^{3+}$ , en la lámina de brucita y que debe ser compensada por el anión correspondiente en el espacio interlaminar. La cantidad de anión intercalado y la relación anión/Al se calcularon a partir del contenido de carbono de cada muestra, teniendo en cuenta el contenido de carbono de cada anión interlaminar.

En el caso de la hidrotalcita de partida ( $HTCO_3$ ), si la carga laminar generada por el Al estuviera totalmente compensada por el anión divalente  $CO_3^{2-}$ , cabría esperar una relación C/Al igual a 0.5. Los datos experimentales muestran un contenido en carbono algo superior (Tabla IV.5), que podría deberse a la presencia de trazas de impurezas C en la muestra o, como han señalado otros autores, a un exceso de carbonato adsorbido en la superficie externa del mineral, probablemente debido a la elevada afinidad de este anión por la superficie de la hidrotalcita (Miyata, 1983; Barriga et al., 2002; Bruna, 2010). Esta cantidad residual de carbono se mantiene en la muestra calcinada  $HT_{500}$  (Tabla IV.5). El exceso de carbonato asociado a la superficie externa de la hidrotalcita podría explicarse si parte del mismo se encontrara formando un complejo monodentado con la superficie (Miyata, 1975) o estuviera en forma de bicarbonato (Serna et al., 1977), ya que en estos casos cada anión compensaría una única carga superficial en vez de compensar dos, que es lo que ocurre cuando la interacción del carbonato con las láminas de hidrotalcita tiene lugar en forma de complejo bidentado (Fig. IV.13) (Labajos et al., 1991; Xu et al., 2008).

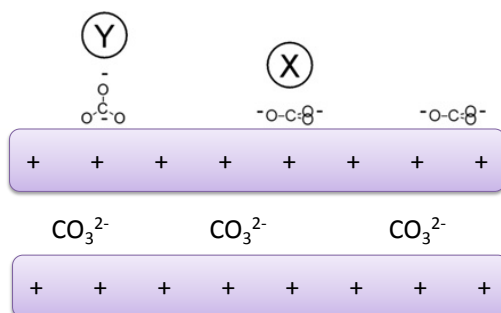


Fig. IV.13. Posibles disposiciones monodentada (Y) y bidentada (X) del anión carbonato en la superficie externa de las partículas de hidrotalcita (según Xu et al., 2008)

Para las organohidrotalcitas, asumiendo que el contenido en carbono de las muestras corresponde en su totalidad al anión orgánico interlaminar, la relación C/Al constituye una medida de la cantidad de anión orgánico intercalado por unidad de carga en la hidrotalcita. En el caso de los aniones orgánicos utilizados en este trabajo, el valor teórico de la relación C/Al sería 18 para las hidrotalcitas modificadas con ELA, OLE, LINO y LINOLEN y 12 para la modificada

con DDS, ya que cada anión de 18 átomos de carbono, en el caso de los ácidos grasos, o de 12 átomos de carbono, en el caso del DDS, compensaría la carga generada por cada ión  $\text{Al}^{3+}$  en la estructura de la hidrotalcita. En todos los casos se observó una relación C/Al muy próxima al valor teórico esperado, dando como resultado relaciones anión/Al próximas a la unidad (Tabla IV.5). Este resultado refleja la completa incorporación de los aniones orgánicos durante el proceso de reconstrucción, en el que dichos aniones orgánicos se añadieron en una cantidad próxima a la capacidad de intercambio aniónico de la hidrotalcita de partida. Es de destacar que, aunque el análisis elemental de las muestras no permitió diferenciar entre el carbono orgánico y el inorgánico presente en las mismas, el análisis por espectroscopia de infrarrojos, cuyos resultados se discutirán en el apartado IV.3.1.5, indicó la ausencia de cantidades apreciables de carbonato en las muestras de organohidrotalcita.

Sobre la base de los resultados obtenidos tras el análisis elemental de las muestras y asumiendo una estructura tipo hidrotalcita para las mismas (u óxido mixto en el caso de  $\text{HT}_{500}$ ), pudo proponerse una fórmula estructural para cada una de ellas, las cuales se detallan en la Tabla IV.6. Teniendo en cuenta que la fórmula esperada para las organohidrotalcitas preparadas en este trabajo era  $[\text{Mg}_3\text{Al}(\text{OH})_8]^+[\text{A}^-]\cdot n\text{H}_2\text{O}$ , las fórmulas obtenidas resultaron ser muy próximas a la esperada, lo que demuestra no sólo la correcta coprecipitación de los metales durante la formación de la hidrotalcita, sino además la validez del procedimiento de reconstrucción utilizado, a partir del producto calcinado, con el fin de incorporar los aniones orgánicos estudiados en una cantidad próxima a la capacidad de intercambio aniónico de la hidrotalcita de partida.

Tabla IV.6. Fórmulas propuestas para las muestras de hidrotalcita y organohidrotalcitas preparadas.

Muestras	Fórmula propuesta <sup>a</sup>
$\text{HTCO}_3$	$\text{Mg}_{3.04}\text{Al}_{0.96}(\text{OH})_8(\text{CO}_3)_{0.59} \cdot 2.6\text{H}_2\text{O}$
$\text{HT}_{500}$	$\text{Mg}_{6.11}\text{Al}_{1.93}\text{O}_9$
HT-ELA	$\text{Mg}_{3.04}\text{Al}_{0.96}(\text{OH})_8(\text{ELA})_{1.04} \cdot 2.7\text{H}_2\text{O}$
HT-OLE	$\text{Mg}_{3.03}\text{Al}_{0.97}(\text{OH})_8(\text{OLE})_{1.06} \cdot 3.7\text{H}_2\text{O}$
HT-LINO	$\text{Mg}_{3.05}\text{Al}_{0.95}(\text{OH})_8(\text{LINO})_{1.05} \cdot 4.0\text{H}_2\text{O}$
HT-LINOLEN	$\text{Mg}_{3.05}\text{Al}_{0.94}(\text{OH})_8(\text{LINOLEN})_{1.07} \cdot 5.0\text{H}_2\text{O}$
HT-DDS	$\text{Mg}_{3.04}\text{Al}_{0.95}(\text{OH})_8(\text{DDS})_{0.91} \cdot 3.6\text{H}_2\text{O}$

<sup>a</sup> La cantidad de agua en las muestras se calculó por diferencia.

### IV.3.1.2. Difracción de rayos X

En la Fig. IV.14 se muestran los difractogramas de la hidrotalcita de partida ( $\text{HTCO}_3$ ), su producto de calcinación a  $500\text{ }^\circ\text{C}$  ( $\text{HT}_{500}$ ) y del producto resultante de la rehidratación del producto calcinado en disolución acuosa al mismo pH al que se llevó a cabo la síntesis de las organohidrotalcitas. Esta última muestra se preparó a modo de blanco de las diferentes organohidrotalcitas sintetizadas.

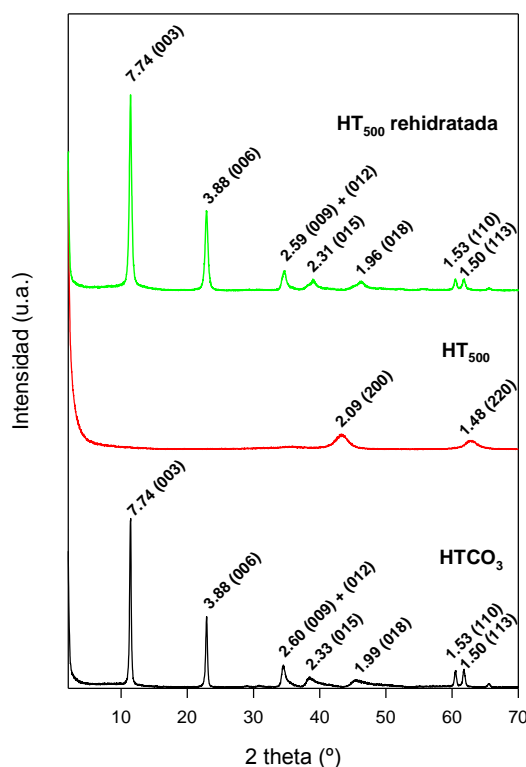


Fig. IV.14. Difractograma de rayos X de la hidrotalcita ( $\text{HTCO}_3$ ), la hidrotalcita calcinada ( $\text{HT}_{500}$ ) y la hidrotalcita calcinada rehidratada

$\text{HTCO}_3$ : El diagrama obtenido es típico de una hidrotalcita bien cristalizada, con difracciones intensas, estrechas y simétricas a valores de  $2\theta$  bajos y difracciones de menor intensidad, más anchas y asimétricas a valores de  $2\theta$  elevados (Donato et al., 2012). Los picos que aparecen en el difractograma son característicos de una hidrotalcita sin impurezas y su asignación se incluye en la Fig. IV.14. Las difracciones correspondientes a los planos (003), (006), (009) aparecen a 7.74, 3.88 y 2.60 Å, respectivamente, y están de acuerdo con

lo esperado para una hidrotalcita con carbonato como anión interlaminar (Barriga et al., 2002; Costa et al., 2008; Donato et al., 2012). A partir del valor del espaciado obtenido para el plano (003),  $d_{003}$ , puede calcularse el valor del parámetro  $c'$  como  $c'=3d_{003}$ , dando un valor de 23.22 Å, y, considerando que el espesor de la capa de brucita es de 4.8 Å, la distancia entre capas,  $h$ , puede calcularse como  $h= d_{003}-4.8$ , dando un valor de  $h= 2.94$  Å. La distancia media catión-catión o parámetro  $a$ , que depende del tamaño de los cationes laminares y del valor de  $x$ , puede calcularse a partir del pico de difracción asignado al plano (110) como  $a= 2d_{110}$ . En nuestro caso, el valor obtenido,  $a= 3.06$  Å, está de acuerdo con el observado por otros autores para hidrotalcitas de Mg y Al con una relación Mg:Al de 3:1 (Miyata, 1980).

HT<sub>500</sub>: El diagrama es también característico de una hidrotalcita calcinada en el que se ha producido la formación del óxido mixto correspondiente, Mg(Al)O, de baja cristalinidad y con una estructura tipo periclase (MgO). Las dos difracciones anchas a 2.09 y 1.48 Å que aparecen en el difractograma se corresponden con los planos (200) y (220) de la estructura cúbica del MgO (Miyata, 1980; Reichle et al., 1986; Barriga et al., 2002).

HT<sub>500</sub> rehidratada: El difractograma del producto resultante de la rehidratación del producto calcinado, en condiciones análogas a las utilizadas para la síntesis de las organohidrotalcitas, pone de manifiesto la regeneración de la estructura laminar de la hidrotalcita tras el proceso de rehidratación. El difractograma es muy similar al de la muestra de hidrotalcita original y revela una elevada cristalinidad de la muestra rehidratada, que probablemente ha incorporado  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{OH}^-$  de la disolución como principales aniones interlaminares.

Organohidrotalcitas: La Fig. IV.15a muestra los difractogramas de polvo de las organohidrotalcitas obtenidos en el rango de  $2\theta$  de 1.5 a 70 grados, mientras que la Fig. IV.15b muestra el detalle de la región de 1.5 a 20 grados para cada una de las muestras, obtenido con un equipo D8 DISCOVER de la marca BRUKER, de mayor resolución a ángulos bajos.

En comparación con los difractogramas de las muestras de hidrotalcita original y rehidratada, lo primero que se observa es una menor definición de los picos de difracción para todas las organohidrotalcitas (Fig. IV.15a), de forma que la presencia de los aniones orgánicos parece haber dificultado el ordenamiento de las láminas durante el proceso de reconstrucción, dando lugar a estructuras de menor cristalinidad. La presencia de los aniones orgánicos modifica el valor del espaciado basal, aunque se mantiene la distancia media catión-catión, tal y como refleja el hecho de que el valor del parámetro  $a$  para las organohidrotalcitas es prácticamente idéntico al de las muestras de hidrotalcita original y rehidratada (3.06 Å). La presencia del "halo" que se observa en los difractogramas de todas las organohidrotalcitas en torno a  $20^\circ 2\theta$  (4.3 Å) se ha observado en otras organohidrotalcitas y se ha atribuido al

empaquetamiento lateral de los aniones orgánicos en el espacio interlaminar (Kameshima et al., 2006)

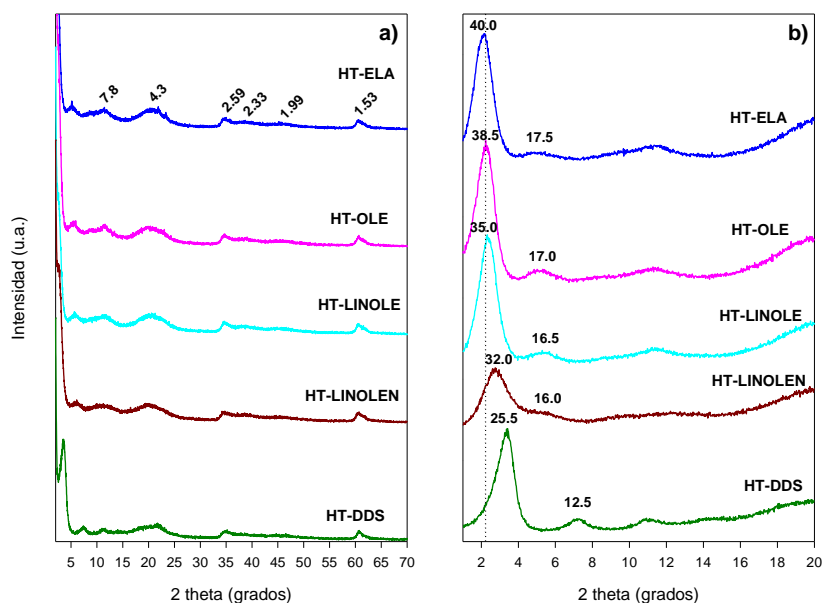


Fig. IV.15. Difractogramas de rayos X de las organohidrotalcitas (a) y detalle de la región de ángulos más bajos de las mismas muestras (b)

a) Dodecilsulfato: La muestra **HT-DDS** presenta un valor del espaciado basal de 25.5 Å, observándose el segundo orden a 12.5 Å (Fig. IV.15b). Si restamos el espesor de la lámina de hidrotalcita (4.8 Å), la distancia entre láminas o parámetro h resulta ser de 20.7 Å, que coincide casi exactamente con el tamaño del anión dodecilsulfato, estimado en aproximadamente 20.8 Å (Clearfield et al., 1991). Por tanto, la conformación más probable para la muestra HT-DDS preparada en este trabajo es la que se muestra en la Fig. IV.16a, donde las cadenas alifáticas del DDS forman una monocapa alternando sus extremos entre dos láminas adyacentes y se sitúan de forma casi perpendicular a dichas láminas. El espaciado obtenido, no obstante, es también compatible con una cierta inclinación de las cadenas orgánicas acompañada de una cierto deslizamiento de las mismas, tal y como se muestra en la Fig. IV.16b, siguiendo la expresión:

$$h = d_{003} - 4.8 = 2L - s \operatorname{sen} \alpha$$

donde h (Å) es la distancia entre láminas en la organohidrotalcita ( $h = d_{003} - 4.8$ ), L (Å) es la longitud del anión interlaminar, s (Å) es una medida del grado de solapamiento entre cadenas orgánicas adyacentes y  $\alpha$  (grados) es el

ángulo que forma la cadena orgánica con la lámina de hidrotalcita. La máxima inclinación de las cadenas ocurriría para  $s = 0$  (bicapa), lo que, de acuerdo con nuestros valores de  $d_{003}$  (25.5 Å) y  $L$  (20.8 Å), implicaría un ángulo entre la cadena orgánica y la superficie de unos 30°. Por otra parte, un total solapamiento de las cadenas orgánicas (monocapa, Fig. IV.16a) supondría que  $s = L$ , lo que implicaría un valor de  $\alpha$  próximo a los 90°. Esta última disposición, que coincide con la que se representa en la Fig. IV.16a, ha sido la propuesta por otros autores para muestras similares de hidrotalcita Mg:Al (3:1) intercaladas con el anión DDS, probablemente porque con ella se maximiza la interacción hidrofóbica entre las cadenas alquílicas de aniones orgánicos adyacentes (Clearfiend et al., 1991; Bruna, 2010).

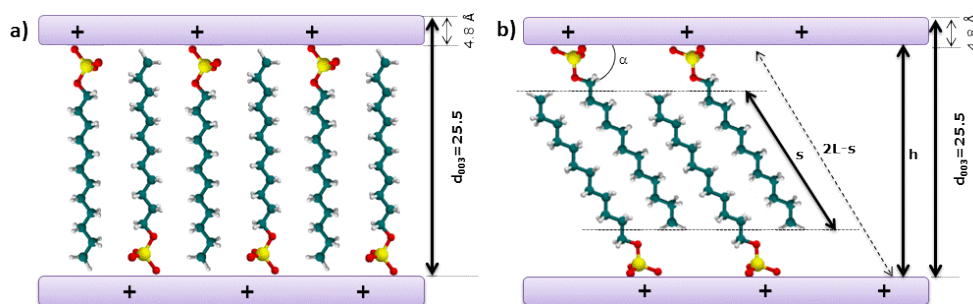


Fig. IV.16. Esquema de la posible disposición de los aniones DDS en la muestra HT-DDS

b) Elaidato: La muestra **HT-ELA** presentó un valor del espaciado basal de 40 Å (Fig. IV.15b). El doble enlace *trans* presente en el anión elaidato le confiere una estructura prácticamente lineal, similar a la del DDS, pero con una mayor longitud de la cadena,  $L$ , de unos 24.5 Å (Xu et al., 2004; Iyi et al., 2009).

Una disposición en monocapa vertical del anión elaidato en la muestra HT-ELA, similar a la propuesta para el DDS, hubiera dado como resultado un valor del espaciado de unos 29 Å, que es inferior al valor experimental encontrado para dicha muestra (40 Å). El valor experimental obtenido sugiere, por tanto, un cierto deslizamiento entre las cadenas alquílicas, que podrían disponerse verticalmente (con un valor de  $s$  de unos 14 Å, Fig. IV.17a) o adoptando una cierta inclinación respecto a las láminas del LDH. De hecho, es habitual asumir que los carboxilatos de cadena lineal adoptan una inclinación de unos 60° cuando interaccionan con la superficie de los LDHs, ya que esta inclinación, similar a la que presentan los ácidos grasos saturados en sus cristales, permite la interacción del grupo carboxilato a través de sus dos átomos de oxígeno con la superficie hidroxilada del hidróxido doble laminar (Itoh et al., 2003; Xu et al., 2004; Iyi et al., 2009). De asumir dicha inclinación en nuestra muestra, el solapamiento entre cadenas sería de unos 8 Å, dando una

estructura similar a la representada en la Fig. IV.17b. Esta disposición es una situación parecida a la estructura en monocapa propuesta por Xu et al. (2004) para una hidrotalcita Zn/Al 2:1 intercalada con elaidato, único trabajo que hemos encontrado en la bibliografía que utiliza el elaidato como anión modificador para la preparación de organo-LDHs.

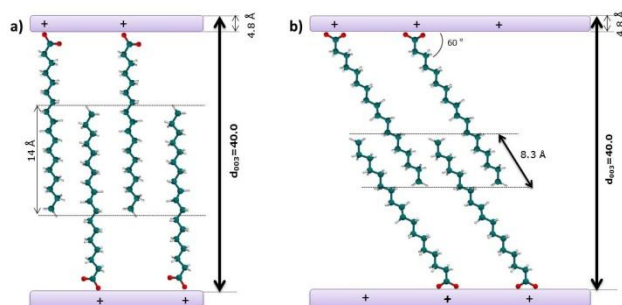


Fig. IV.17. Esquema de la posible disposición de los aniones ELA en la muestra HT-ELA

c) Oleato, linoleato y linolenato: Las muestras HT-OLE, HT-LINO y HT-LINOLEN se caracterizan por la presencia de uno (OLE), dos (LINO) o tres (LINOLEN) dobles enlaces en *cis* en la cadena alquílica del anión modificador. Los dobles enlaces en *cis* provocan una curvatura en la cadena alquílica que condiciona el empaquetamiento de estos aniones en la interlámina del hidróxido doble laminar (Lagaly, 1981; Xu et al., 2004).

En el caso del anión OLE, el doble enlace está situado, como en el elaidato, en la mitad de la cadena (carbono 9), lo que podría forzar al anión orgánico a adoptar un empaquetamiento similar al que se representa en la Fig. IV.18a, en el que las cadenas alquílicas solapan parcialmente, tal y como proponen Xu et al. (2004). El valor del espaciado para nuestra muestra HT-OLE ( $d_{003}=38.5 \text{ \AA}$ ) es similar al valor de  $36 \text{ \AA}$  observado por Xu et al. (2004) para muestras HT (Zn/Al)-OLE preparadas por intercambio iónico y prácticamente idéntico al valor de  $38\text{-}39 \text{ \AA}$  que encuentran Kameshima et al. (2006), Inomata y Ogawa (2006) y Zhou et al. (2010) para muestras HT (Mg/Al)-OLE preparadas por síntesis directa o por reconstrucción de hidrotalcitas calcinadas.



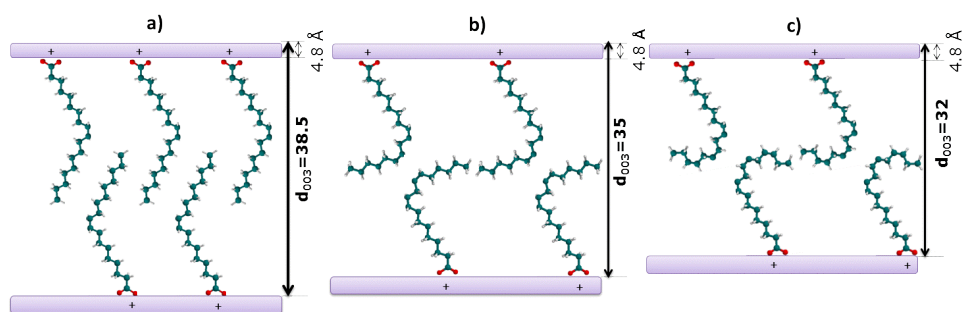


Fig. IV.18. Esquema de la posible disposición de los aniones OLE, LINO y LINOLEN en las muestras HT-OLE, HT-LINO y HT-LINOLEN

Para las muestras HT-LINO y HT-LINOLEN es difícil postular una estructura definida bien ordenada de los aniones orgánicos, debido a que los dobles enlaces pliegan varias veces la cadena alquílica dificultando el solapamiento de las mismas (Fig. IV.18b y c). No obstante, los espaciados basales de 35 Å para HT-LINO y 32 Å para HT-LINOLEN reflejan cómo los plegamientos provocados por los dobles enlaces en *cis* disminuyen progresivamente la distancia interlaminar y también el ordenamiento de las láminas. En las Fig. IV.18b y c se ilustran posibles disposiciones de los aniones LINO y LINOLEN compatibles con los espaciados basales encontrados.

Hay que destacar que los aniones intercalados en la interlámina también pueden disponerse mediante la conformación *gauche* de algunos de sus enlaces simples (Fig. IV.19a). Esta conformación se produce cuando los grupos metilenos se acercan unos a otros, lo que genera un cierto impedimento estérico. No obstante, la presencia de enlaces simples en conformación *gauche* hace que en cadenas alifáticas que poseen dobles enlaces en *cis*, tras sufrir una torsión tipo *gauche* ( $g^+$  o  $g^-$ ), tomen una conformación más lineal (Fig. IV.19b) (Gennis, 1989). Por cada torsión que sufre la cadena, ésta sufre un acortamiento de aproximadamente 1.27 Å (Lagaly et al., 1977).

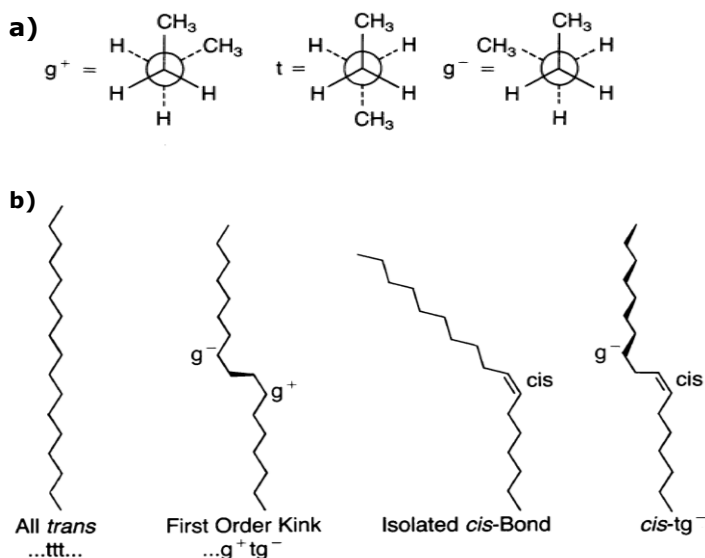


Fig. IV.19. Proyección Newman de la configuración *gauche* y *trans* (a) y distintas configuraciones de cadenas alquílicas (b), según Gennis (1989)

La torsión que provocaría uno, dos o tres enlaces en configuración *gauche* en los aniones OLE, LINO y LINOLEN haría que las cadenas adoptasen una conformación más lineal y pudieran organizarse de una forma más ordenada, mejorando y estabilizando el empaquetamiento (Fig. IV.20). Esta disposición es muy posible que se pueda dar, ya que estaría de acuerdo con los espaciados basales obtenidos en este trabajo, teniendo en cuenta que por cada torsión se reduce la longitud de la cadena en aproximadamente 1.25 Å. La Fig. IV.20 representa los aniones OLE, LINO y LINOLEN con torsiones tipo *gauche*, que mejoran el empaquetamiento de los aniones en la interlámina en comparación con el empaquetamiento representado en la Fig. IV.18.

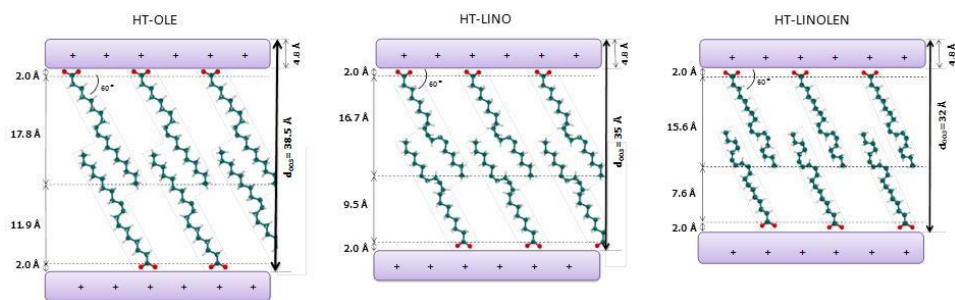


Fig. IV.20. Posibles estructuras de las organohidrotalcitas HT-OLE (a), HT-LINO (b) y HT-LINOLEN (c) con algunos de los enlaces simples de las cadenas alquílicas en configuración *gauche* para que las cadenas adopten una conformación pseudo-lineal.

### IV.3.1.3. Microscopía electrónica de barrido y de transmisión

La Fig. IV.21a muestra la morfología de partículas correspondientes a la hidrotalcita de partida  $\text{HTCO}_3$  preparada en este trabajo obtenida por SEM. La imagen muestra la existencia de cristales hexagonales bien definidos y con un tamaño bastante homogéneo en torno a  $0.1\ \mu\text{m}$ . Esta morfología está de acuerdo con la bibliografía, que indica que los LDHs con aniones inorgánicos en sus espacios interlaminares suelen formar cristales hexagonales cuyo tamaño oscila entre 50 nm y algunas micras (Reichle et al., 1986; Labajos et al., 1992; Inomata y Ogawa, 2006; Zhang et al., 2010). Por una parte, el crecimiento de los cristales a lo largo de los ejes a y b provoca un aumento del número de grupos hidroxilos expuestos a la fase acuosa, lo que es favorable desde el punto de vista energético. Por otra, dicho crecimiento supone la formación de enlaces Mg-OH ó Al-OH, que, desde el punto de vista termodinámico, es más favorable que el apilamiento de láminas a lo largo del eje c a través de interacciones electrostáticas (Xu y Bateman, 2010). Estos factores favorecen el crecimiento de los cristales a lo largo de los ejes a y b, provocando la formación de los hexágonos relativamente planos que aparecen en la Fig. IV.21a.

Las Fig. IV.21b y c muestran imágenes obtenidas por SEM de las muestras HT-ELA y HT-LINOLEN. Los estudios previos muestran que, en general, la morfología de las organohidrotalcitas puede ser muy diferente dependiendo de los efectos funcionales y estéricos provocados por el anión orgánico en el crecimiento de los cristales (Xu y Bateman, 2010). No obstante, a menudo los aniones orgánicos provocan la formación de cristales planos, irregulares y a veces curvados, tal y como se observa en la Fig. IV.21 para las muestras HT-ELA y HT-LINOLEN preparadas en el presente estudio (Costa et al., 2008; Iyi et al., 2009; Otero et al., 2012). La forma plana, más o menos hexagonal, refleja la morfología de las láminas del LDH, que pierden definición por la flexibilidad del anión orgánico situado en el espacio interlaminar. La curvatura se ha atribuido a la interacción hidrofóbica entre cadenas alquílicas situadas en los bordes de las partículas, que provocan una cierta torsión de las mismas (Xu y Bateman, 2010).

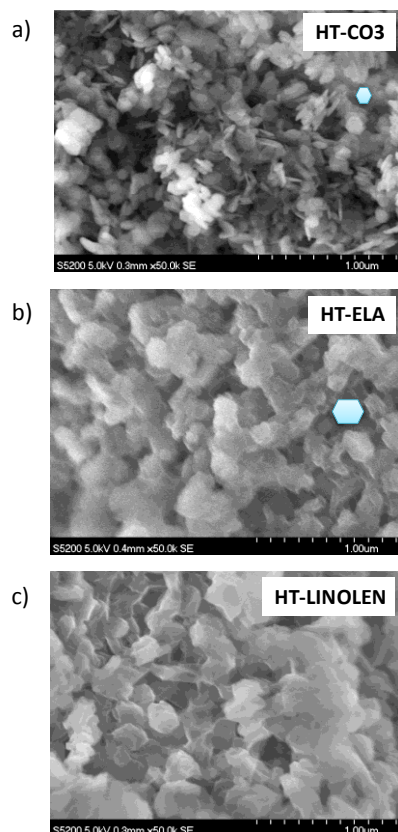


Fig. IV.21. Fotografías tomadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las muestras HT-CO<sub>3</sub>, HT-ELA y HT-LINOLEN

La Fig. IV.22 muestra las imágenes tomadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las muestras HT-ELA y HT-LINOLEN. A pesar de que la visualización del apilamiento de las láminas individuales de los LDHs por TEM no es fácil debido a que las partículas tienden a depositarse con el eje *c* perpendicular al plano del soporte (Xu et al., 2004), en algunas regiones de las muestras pudo distinguirse dicho apilamiento (Fig. IV.22). Las franjas de mayor contraste corresponden a las láminas del LDH, mientras que las franjas de menor contraste corresponden a espacios ocupados por el anión interlamilar (Xu et al., 2004). Puede apreciarse la morfología laminar, a veces curvada, de las láminas del LDH, con una separación interlamilar que, aunque variable, coincidió razonablemente con la esperada a partir de los difractogramas de las muestras. En la Fig. IV.22, se han resaltado láminas separadas por unos 40 Å en la muestra HT-ELA y por unos 32 Å en la muestra HT-LINOLEN.

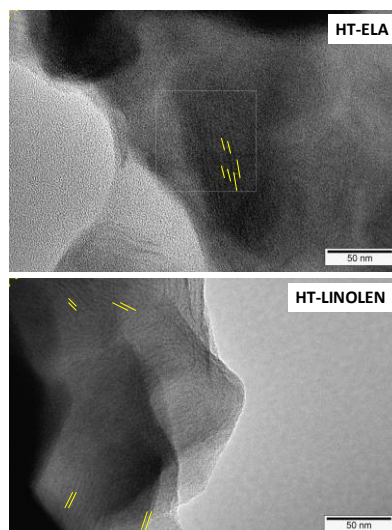


Fig. IV.22. Fotografías tomadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las muestras HT-ELA y HT-LINOLEN

#### IV.3.1.4. Espectroscopia de infrarrojos

La Fig. IV.23 muestra los espectros de infrarrojos de la hidrotalcita de partida, de su producto calcinado y del producto resultante de la rehidratación de éste último, preparado como blanco.

En el espectro de infrarrojos de la hidrotalcita sin modificar, la banda ancha que aparece en torno a  $3500\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de tensión de los grupos hidroxilos del mineral y del agua adsorbida ( $\nu_{\text{OH}}$ ), la banda a  $1650\text{ cm}^{-1}$  a la vibración de deformación  $\delta_{\text{O-H}}$  del agua adsorbida y la banda a  $1365\text{ cm}^{-1}$  al modo vibracional de tensión  $\nu_3$  del ión carbonato (Barriga et al., 2002; Rives, 2002). Es apreciable la desviación que ésta última banda presenta con respecto a su posición para el carbonato libre ( $1415\text{ cm}^{-1}$ ) y que refleja la interacción de los grupos carbonatos con el entorno interlaminar. La banda a  $3500\text{ cm}^{-1}$  presenta un hombro centrado en torno a  $3000\text{ cm}^{-1}$  que se ha atribuido al agua fuertemente asociada a los iones carbonatos en la interlámina (Hernández-Moreno et al., 1985; Labajos et al., 1992). Las vibraciones Mg-O y Al-O, así como los modos de vibración  $\nu_2$  y  $\nu_4$  del carbonato, aparecen por debajo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  (Barriga et al., 2002).

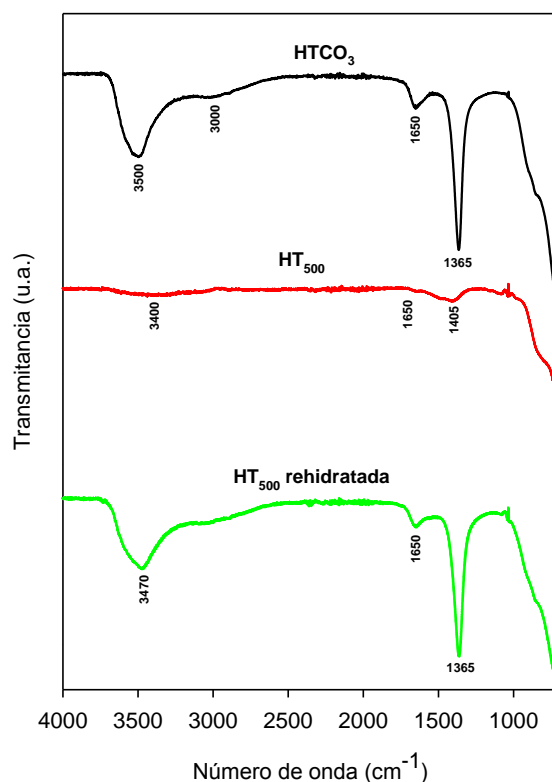


Fig. IV.23. Espectros de infrarrojos de la hidrotalcita carbonatada ( $\text{HTCO}_3$ ), calcinada ( $\text{HT}_{500}$ ) y rehidratada ( $\text{HT}_{500}$  rehidratada)

La muestra correspondiente al producto calcinado ( $\text{HT}_{500}$ ) refleja la pérdida casi total del agua adsorbida y la deshidroxilación y decarbonatación del material. Se observaron pequeños hombros en el espectro a  $3400\text{ cm}^{-1}$ ,  $1650\text{ cm}^{-1}$  y  $1405\text{ cm}^{-1}$ , que pueden atribuirse a pequeñas cantidades de agua y carbonato adsorbidos por la muestra tras exponerla al aire (Barriga et al., 2002; Costa et al., 2008).

El espectro de infrarrojos de la muestra obtenida tras la rehidratación del producto calcinado, en condiciones análogas a las utilizadas para la síntesis de las organohidrotalcitas, fue muy similar al de la muestra de hidrotalcita original, observándose la reaparición de las bandas  $\nu_{\text{O-H}}$  a  $3470\text{ cm}^{-1}$ ,  $\delta_{\text{O-H}}$  a  $1650\text{ cm}^{-1}$  y  $\nu_{3-\text{CO}_3}$  a  $1365\text{ cm}^{-1}$ . El pequeño desplazamiento observado en la banda  $\nu_{\text{O-H}}$  respecto a su posición en la hidrotalcita original podría reflejar variaciones en el ambiente interlaminar, por ejemplo, en cuanto a las cantidades relativas de  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{OH}^-$  en las posiciones de cambio, pues mientras que la síntesis de la hidrotalcita original se llevó a cabo en presencia de elevadas concentraciones tanto de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.74 M) como de  $\text{NaOH}$  (3.2 M), la rehidratación se llevó a

cabo en una disolución acuosa de NaOH 3 mM, en presencia del carbonato disuelto en equilibrio con el CO<sub>2</sub> atmosférico.

Los espectros de infrarrojos de las diferentes organohidrotalcitas preparadas se muestran en la Fig. IV.24, resumiéndose en la Tabla IV.7 las principales asignaciones de las bandas encontradas en cada uno de ellos. La asignación de las bandas correspondientes a los aniones orgánicos se realizó de acuerdo con Bellamy (1975).

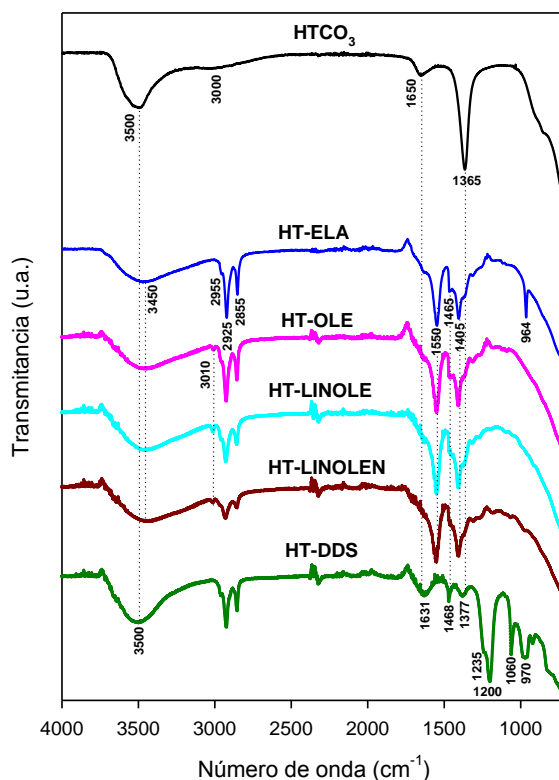


Fig. IV.24. Espectros de infrarrojos de la hidrotalcita carbonatada (HTCO<sub>3</sub>) y de las organohidrotalcitas

Dada la similitud estructural de los ácidos grasos utilizados para la modificación de la hidrotalcita, los espectros de las muestras HT-ELA, HT-OLE, HT-LINO y HT-LINOLEN presentaron características comunes. Así, en todas estas muestras la banda correspondiente a la vibración de tensión de los grupos hidroxilos de la hidrotalcita aparece centrada en torno a 3450 cm<sup>-1</sup> (con desaparición del hombro a 3000 cm<sup>-1</sup> correspondiente al agua asociada al carbonato interlaminar), las vibraciones correspondientes a los grupos -CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>3</sub> del anión modificador aparecen cerca de 2955 y 2925 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>C-H asim</sub>), 2855

$\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}} \text{ sim}$ ) y  $1440\text{-}1460 \text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{C-H}}$ ), la vibración de deformación del agua adsorbida aparece a  $1630 \text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{O-H}}$ ) y las vibraciones de tensión antisimétrica y simétrica correspondientes a los grupos carboxílicos en sus formas aniónicas ( $\nu_{\text{COO-asim}}$  y  $\nu_{\text{COO-sim}}$ ) se identificaron próximas a  $1550$  y  $1405 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Es de destacar la ausencia en los espectros de bandas atribuibles a las vibraciones de tensión  $\text{C=O}$  de grupos carboxílicos protonados (Xu et al., 2004; Xu y Braterman, 2010), lo que indica que ELA, OLE, LINO y LINOLEN se encuentran asociados a la hidrotalcita en sus formas aniónicas. El hecho de que la vibración de tensión de los grupos hidroxilos de las láminas de hidrotalcita aparezca en HT-ELA, HT-OLE, HT-LINO y HT-LINOLEN desplazada hacia menores números de onda respecto a su posición en la hidrotalcita sin modificar (Fig. IV.24) podría reflejar precisamente la fuerte interacción de los grupos carboxilatos de los aniones modificadores con los grupos OH superficiales de las láminas de hidrotalcita. En todas las muestras se observó un pequeño hombro a  $1365 \text{ cm}^{-1}$  que podría corresponder bien a vibraciones de deformación de  $-\text{CH}_3$  ó de  $-\text{CH}_2-$ , o también indicar una pequeña cantidad residual de iones carbonato ocupando algunas de las posiciones de cambio de la hidrotalcita (Costa et al., 2008). Finalmente, como características distintivas de los espectros, cabe destacar la presencia de la banda a  $964 \text{ cm}^{-1}$  en el espectro de HT-ELA, que puede atribuirse a la vibración de deformación fuera del plano de los grupos C-H adyacentes al doble enlace en *trans* del anión elaidato, y la presencia de la banda cercana a  $3010 \text{ cm}^{-1}$  en los espectro de HT-OLE, HT-LINO y HT-LINOLEN, que corresponde a la vibración de tensión de los grupos C-H adyacentes a los dobles enlaces en *cis* de los aniones correspondientes (Xu et al., 2004).

El espectro de la muestra HT-DDS estuvo de acuerdo con el obtenido con anterioridad por otros autores para hidrotalcitas modificadas con dodecilsulfato (Cavani et al., 1991). Aparte de las vibraciones correspondientes a la cadena alquílica, destaca el doblete característico de la vibración de tensión de los grupos  $\text{S=O}$  del anión dodecilsulfato ( $\nu_{\text{S=O}}$ ) que aparece a  $1235$  y  $1200 \text{ cm}^{-1}$ . Además, las bandas que aparecen en el rango  $900\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$  también se han asignado a modos de vibración de tensión del grupo sulfato (Clearfield et al., 1991; Wang et al., 2005; Bouraada et al., 2009). Por otra parte, la muestra HT-DDS reflejó un menor desplazamiento de la banda correspondiente a los grupos hidroxilos de las láminas de hidrotalcita, que se mantuvo más próxima a su posición en la hidrotalcita original ( $3500 \text{ cm}^{-1}$ ), así como una mayor intensidad de la banda de carbonato, a  $1377 \text{ cm}^{-1}$ , lo que estaría de acuerdo con los resultados del análisis elemental que indicaron un contenido en anión orgánico de la muestra HT-DDS ligeramente inferior al del resto de las organo-hidrotalcitas preparadas Tabla IV.7.



## Capítulo IV. Sistema hidrotalcita-ácidos grasos insaturados

Tabla IV.7. Asignaciones de las principales bandas encontradas en los espectros de infrarrojos de las organohidrotalcitas.

Asignación	NÚMERO DE ONDA (cm <sup>-1</sup> )				
	HT-ELA	HT-OLE	HT-LINO	HT-LINOLEN	HT-DDS
$\nu_{OH}$	3460	3460	3460	3460	3500
$\nu_{=CH}$ cis	-	3006	3009	3011	-
$\nu_{CH}$ asim	2955	2954	2956	2958	2955
	2922	2924	2926	2928	2922
$\nu_{CH}$ sim	2852	2853	2855	2855	2852
	2871	2871	2871	2871	2871
$\delta_{OH}$	1630	1630	1630	1630	1630
$\nu_{COO}$ -asim	1544	1547	1547	1550	-
$\delta_{CH}$	1438-1466	1440-1466	1440-1466	1439-1466	1440-1468
$\nu_{COO}$ -sim	1406	1406	1406	1406	-
$\nu_{S=O}$	-	-	-	-	1235
	-	-	-	-	1200
$\delta_{=CH}$ trans fuera del plano	963	-	-	-	-

### IV.3.1.5. Medidas de potencial Z

La Fig. IV.25 muestra las gráficas de distribución de potencial Z obtenidas para la hidrotalcita de partida y para las diferentes organohidrotalcitas preparadas. Las medidas se realizaron al pH resultante de las correspondientes suspensiones acuosas de las muestras (0.15 mg/ml) y que osciló en un rango de 7-8 dependiendo de la muestra.

La muestra de hidrotalcita original presentó valores de potencial Z positivos, distribuidos entre +5 y +40 mV y con un máximo a +25.3 mV (Fig. IV.25), próximo al encontrado por Xu et al. (2008) para una hidrotalcita Mg/Al (2:1) con carbonato como anión interlamilar (+34 mV). El valor positivo del potencial Z de la hidrotalcita puede atribuirse a las cargas positivas estructurales de sus láminas, que provoca la formación de la doble capa eléctrica en la superficie de las partículas. Aunque cabe esperar que las cargas localizadas en las superficies internas de la hidrotalcita estén completamente compensadas por los aniones interlaminares y, por tanto, no contribuyan al potencial Z, las cargas estructurales localizadas en las superficies externas sí originan una doble capa eléctrica en la que algunos aniones de cambio pueden desplazarse desde la capa rígida o de Stern a la capa difusa (Fig. IV.26), generando el potencial Z positivo observado en nuestras medidas (Xu et al., 2008).

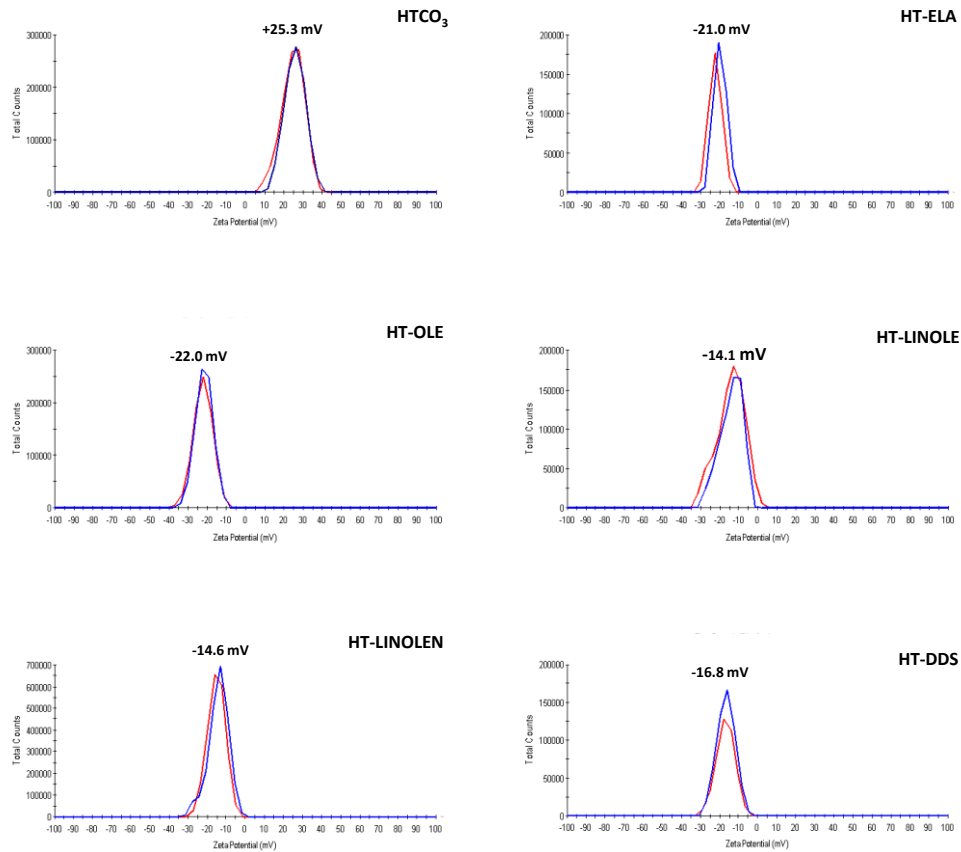


Fig. IV.25. Distribución de potencial Z de la muestra de HTCO<sub>3</sub> original y de las organohidrotalcitas

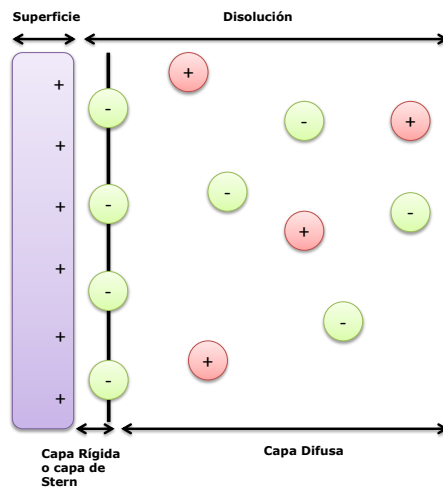


Fig. IV.26. Representación del potencial Z en la muestra HTCO<sub>3</sub>

La modificación de la hidrotalcita con los aniones orgánicos produjo un cambio en la distribución de potencia Z, pasando en todos los casos de valores positivos a negativos, que oscilaron entre -14 y -22 mV. El potencial Z de las organohidrotalcitas siguió el orden: HT-ELA  $\approx$  HT-OLE < HT-DDS < HT-LINO  $\approx$  HT-LINOLEN (Fig. IV.25). Xu et al. (2008) atribuyen la inversión del potencial Z de la hidrotalcita en presencia de aniones orgánicos a un exceso de éstos en la superficie externa de las partículas como resultado de interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alquílicas, en una situación similar a la que se representa en la Fig. IV.27. Es interesante destacar cómo el potencial Z de HT-LINO y HT-LINOLEN es menos negativo que el del resto de las muestras, probablemente como consecuencia de que las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de estos aniones está particularmente dificultada por la presencia de los dos (LINO) o tres (LINOLEN) dobles enlaces en *cis* en su estructura.

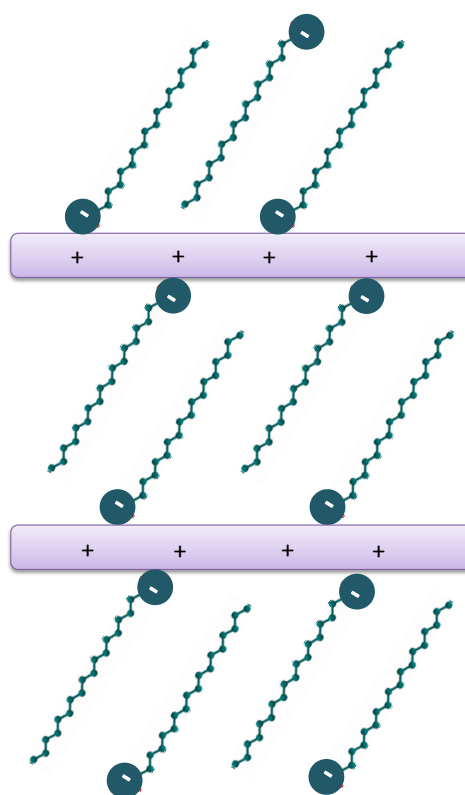


Fig. IV.27. Posible distribución de los aniones orgánicos en las superficies internas y externas de la hidrotalcita, según Xu et al. (2008)

**IV.3.1.6. Estabilidad de las organohidrotalcitas**

La caracterización de las muestras se completó con un estudio en el que se evaluó la estabilidad de las diferentes organohidrotalcitas en una disolución salina de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M. La finalidad de este ensayo fue determinar la posible descomposición de los complejos en presencia de concentraciones relativamente elevadas de sales inorgánicas, ya que ello podría limitar su uso como adsorbente y/o determinar el comportamiento del material en su utilización en aplicaciones medioambientales.

Los datos de la Tabla IV.8 reflejan las cantidades de carbono orgánico medidas en disolución tras agitar durante 24 h 20 mg de cada una de las organohidrotalcitas con 10 ml de disolución de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M. Las cantidades de carbono orgánico disuelto se expresaron como porcentajes del contenido total de carbono orgánico de cada una de las organohidrotalcitas.

Los datos de la Tabla IV.8 demuestran que, excepto para la muestra HT-LINOLEN, las cantidades de carbono orgánico liberadas por las organohidrotalcitas fue muy pequeña, siendo particularmente bajas en el caso de las muestras HT-ELA y HT-OLE (<0.5%) y algo mayores para HT-LINO (2.8%) y HT-LINOLEN (13%). La muestra HT-DDS liberó una cantidad intermedia próxima al 2%. Esta secuencia parece estar relacionada con la hidrofobicidad del anión modificador, probablemente porque ésta determina su tendencia a establecer interacciones hidrofóbicas que estabilicen la estructura de la organohidrotalcita resultante, de forma similar a lo que ocurre con las esmectitas modificadas con cationes orgánicos (Chibwe y Jones, 1983). La presencia de varios dobles enlaces en *cis* en la estructura del ácido, probablemente unida a una consiguiente mayor solubilidad en agua del mismo, dificultaría el establecimiento de tales interacciones hidrofóbicas, dando como resultado una mayor facilidad del anión orgánico a ser liberado al medio, y por consiguiente, una menor estabilidad de la organohidrotalcita.

Tabla IV.8. Porcentaje de carbono orgánico (% TOC) liberado por las organohidrotalcitas en suspensión de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M, expresado en relación al contenido total de carbono de las mismas.

<b>Muestras</b>	<b>% TOC</b>
HT-ELA	0.4
HT-OLE	0.3
HT-LINO	2.8
HT-LINOLEN	12.7
HT-DDS	2.2

### IV.3.2. Evaluación preliminar de las organohidrotalcitas como adsorbentes de plaguicidas y su efecto en la biodisponibilidad

#### IV.3.2.1. Estudios de adsorción

La Fig. IV.28 muestra el porcentaje adsorbido de distintos plaguicidas a los adsorbentes del tipo hidrotalcita preparados en este trabajo, mientras que en las Tablas IV.9, IV.10 y IV.11 se detallan el pH de equilibrio y los valores de los coeficientes de adsorción,  $K_d$ , agrupados para los plaguicidas ácidos, básicos y neutros, respectivamente. Los estudios de adsorción se realizaron a una concentración inicial de plaguicida de 1 mg/l preparada en agua y a una relación sólido:disolución de 20 mg:8 ml.

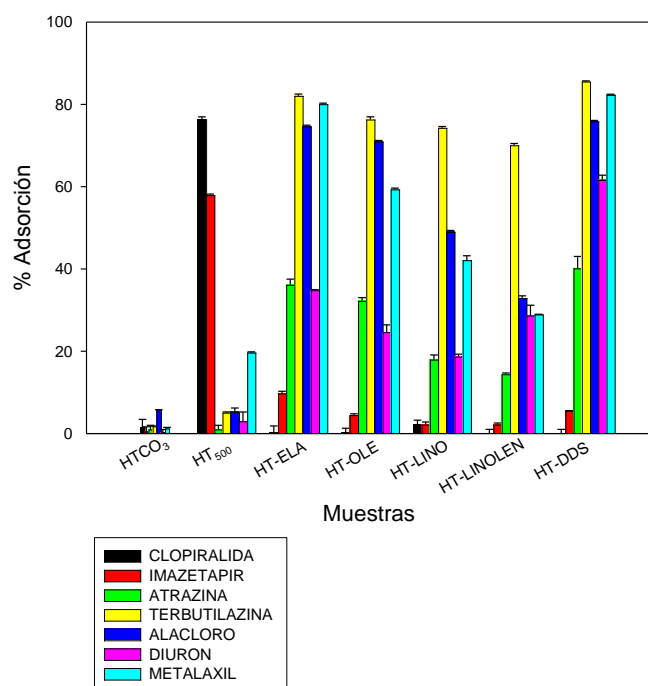


Fig. IV.28. Porcentajes de adsorción de distintos plaguicidas sobre las muestras de hidrotalcita original, calcinada y modificada con aniones orgánicos.

El porcentaje de adsorción dependió del plaguicida y del adsorbente utilizado en cada caso (Fig. IV.28). En el caso de la muestra HTCO<sub>3</sub>, la adsorción no supera el 10% para ningún plaguicida. La muestra HT<sub>500</sub> presenta una elevada capacidad adsorbente para los dos plaguicidas ácidos, clopiralda e imazetapir, con porcentajes adsorbidos del 76 y 58%, respectivamente. Para las muestras de organohidrotalcitas, se observa una mejora de la capacidad de adsorción de los plaguicidas neutros o débilmente básicos respecto a la hidrotalcita tanto original como calcinada, oscilando los porcentajes adsorbidos

entre el 10 y el 80%. La diferente adsorción de los diversos plaguicidas a los adsorbentes puede ser interpretada de acuerdo con el carácter químico de los mismos de la forma siguiente:

**a) Plaguicidas ácidos.** Los herbicidas ácidos, clopiralida e imazetapir, se adsorben en gran medida a la hidrotalcita calcinada (HT<sub>500</sub>), pero muy poco tanto a la hidrotalcita de partida (HTCO<sub>3</sub>) como a las organohidrotalcitas (Tabla IV.9). Este comportamiento está influenciado directamente por la forma aniónica en la que se encuentran estos plaguicidas al pH de equilibrio de las suspensiones (Tabla IV.9). La adsorción de clopiralida e imazetapir a HT<sub>500</sub> ocurre por un mecanismo de reconstrucción por el que estos herbicidas, en sus formas aniónicas, son incorporados en la interlámina durante el proceso de rehidratación de la hidrotalcita calcinada (Sato y Okuwaki, 1991; Hermosín et al., 1993; Celis et al., 1999b; Cardoso y Valim, 2006). La escasa adsorción a la muestra de HTCO<sub>3</sub> original es consecuencia de la elevada afinidad de los aniones carbonatos por las láminas de hidrotalcita, que hace que no sean fácilmente reemplazables por aniones orgánicos a través de un mecanismo de intercambio iónico (Hermosín et al., 1993; Celis et al., 1999b; Pavan et al., 2000; Ulibarri et al., 2001; Inacio et al., 2001). Por último, la escasa adsorción de clopiralida e imazetapir a las organohidrotalcitas probablemente es el resultado de repulsiones entre las formas aniónicas de estos herbicidas y la carga superficial negativa que adquieren las partículas de hidrotalcita tras su modificación con los aniones orgánicos, tal y como reflejan las curvas de potencial Z que se muestran en la Fig. IV.25.

Tabla IV.9. Valores de pH en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de los plaguicidas ácidos clopiralida e imazetapir a las hidrotalcitas, a una concentración inicial de 1 mg/l y una relación sólido disolución de 20 mg:8 ml.

Adsorbentes	Clopiralida		Imazetapir	
	pH <sub>final</sub>	Kd (l/kg)	pH <sub>final</sub>	Kd (l/kg)
HTCO <sub>3</sub>	9.0	6.2 ± 7.9	7.0	< 5
HT <sub>500</sub>	10.7	1293 ± 43	11.7	551 ± 6
HT-ELA	9.6	< 5	9.5	43 ± 3
HT-OLE	9.5	< 5	9.2	< 5
HT-LINO	9.3	9.3 ± 4.1	8.5	8.7 ± 2.8
HT-LINOLEN	8.6	< 5	8.5	8.7 ± 1.7
HT-DDS	8.9	< 5	8.8	23.5 ± 0.1

**b) Plaguicidas Básicos.** Los herbicidas básicos o protonables, atrazina y terbutilazina, presentan una baja afinidad por HTCO<sub>3</sub> y HT<sub>500</sub> y experimentan un aumento de la adsorción a las organohidrotalcitas (Tabla IV.10). Al pH de equilibrio, estos herbicidas se encuentran en su forma no protonada y, por tanto, sin carga. Al ser herbicidas con escasa solubilidad en agua, el aumento en

la adsorción observado en las organohidrotalcitas se puede deber a las interacciones hidrofóbicas que pueden establecerse entre estos herbicidas y la fase orgánica constituida por los aniones orgánicos interlaminares de las organohidrotalcitas.

Tabla IV.10. Valores de pH en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de los plaguicidas básicos atrazina y terbutilazina a las hidrotalcitas, a una concentración inicial de 1 mg/l y una relación sólido disolución de 20 mg:8 ml.

Adsorbentes	Atrazina		Terbutilazina	
	pH <sub>final</sub>	Kd (l/kg)	pH <sub>final</sub>	Kd (l/kg)
HTCO <sub>3</sub>	7.9	< 5	9.1	7.2 ± 0.2
HT <sub>500</sub>	11.7	< 5	10.7	21 ± 1
HT-ELA	8.9	226 ± 14	9.4	1834 ± 55
HT-OLE	8.8	190 ± 2	9.3	1292 ± 48
HT-LINO	8.6	88 ± 7	9.2	1156 ± 20
HT-LINOLEN	8.5	67 ± 2	8.8	936 ± 19
HT-DDS	8.8	270 ± 32	9.2	2368 ± 31

c) Plaguicidas Neutros. Los plaguicidas neutros, alacloro, diurón y metalaxil, son compuestos hidrófobos sin carga y que, por tanto, se comportan de forma similar a los herbicidas básicos cuando éstos se encuentran en sus formas no protonadas. Aunque contienen grupos funcionales con una cierta polaridad (carbonilos, aminos), su adsorción a las superficies altamente hidrofílicas de las muestras de hidrotalcita original y calcinada es escasa, experimentando un incremento de la adsorción en el caso de las organohidrotalcitas (Tabla IV.11). Este incremento en la adsorción puede atribuirse igualmente a interacciones hidrofóbicas entre los plaguicidas y los aniones orgánicos interlaminares, sin descartar alguna posible contribución polar.

El hecho de que la terbutilazina, con menor solubilidad en agua y mayor Kow que la atrazina (Tabla III.2), presente una mayor adsorción a las hidrotalcitas parece confirmar la gran relevancia de las interacciones hidrofóbicas en ambos casos, los herbicidas básicos y neutros-polares.

Tabla IV.11. Valores de pH en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de los plaguicidas neutros alacloro, diurón y metalaxil a las hidrotalcitas, a una concentración inicial de 1 mg/l y una relación sólido disolución de 20 mg:8 ml.

Adsorbentes	Alacloro		Diuron		Metalaxil	
	pH <sub>final</sub>	Kd (l/kg)	pH <sub>final</sub>	Kd (l/kg)	pH <sub>final</sub>	Kd (l/kg)
HTCO <sub>3</sub>	7.7	24.3 ± 0.2	9.1	< 5	8.9	5 ± 1
HT <sub>500</sub>	11.3	22.2 ± 4.2	10.7	13 ± 9	10.6	98 ± 1
HT-ELA	8.8	1178 ± 17	9.4	214 ± 2	9.4	1606 ± 23
HT-OLE	8.4	977 ± 13	9.3	131 ± 13	9.3	584 ± 7
HT-LINO	8.4	384 ± 5	9.2	92 ± 4	9.0	292 ± 13
HT-LINOLEN	8.3	196 ± 4	8.8	162 ± 19	8.3	163 ± 1
HT-DDS	8.4	1255 ± 17	9.2	644 ± 31	9.0	1862 ± 19

A partir de los datos obtenidos queda claro que la modificación de la hidrotalcita con los aniones orgánicos es una buena estrategia para aumentar la afinidad del material para pesticidas sin carga. La capacidad de adsorción de la organohidrotalcita depende de la naturaleza del pesticida y también del anión modificador utilizado para prepararla, de forma que, en general, la capacidad adsorbente de las organohidrotalcitas para los plaguicidas estudiados es muy alta y sigue para la mayoría de los pesticidas el siguiente orden:

$$\text{HT-DDS} > \text{HT-ELA} > \text{HT-OLE} > \text{HT-LINO} > \text{HT-LINOLEN}$$

Esta secuencia indica que las insaturaciones en la cadena alquílica del anión modificador disminuyen la capacidad adsorbente de la organohidrotalcita resultante. En particular, los aniones orgánicos con varios dobles enlaces en configuración *cis*, LINO y LINOLEN, son los que dan lugar a organohidrotalcitas con menor poder adsorbente. Una posible explicación para este comportamiento es que la presencia de dobles enlaces en el anión orgánico, sobre todo cuando se encuentran en configuración *cis*, da lugar a estructuras peor empaquetadas y con un ambiente interlaminaar hidrofóbico, pero menos homogéneo y por tanto, menos propicio para la retención de los pesticidas que las resultantes de la incorporación de aniones orgánicos que se empaquetan de forma más ordenada en el espacio interlaminaar (Fig. IV.16, IV.17 y IV.18).

Asumiendo que la adsorción de los pesticidas a las organohidrotalcitas es debida fundamentalmente a las interacciones hidrofóbicas que pueden establecerse entre los compuestos orgánicos y la fase orgánica interlaminaar del adsorbente, en la Fig. IV.29 se han representado los coeficientes de adsorción



de los diferentes plaguicidas a las organohidrotalcitas normalizados al contenido de carbono orgánico de éstas,  $K_{d-oc}$ , frente al coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) de los plaguicidas, que se dan en la Tabla III.2 y representan una medida de la hidrofobicidad de éstos. Con el fin de poder comparar directamente la eficiencia como adsorbente del carbono orgánico de las organohidrotalcitas con la del carbono orgánico del octanol, los valores de  $K_{ow}$  también se normalizaron respecto al contenido de carbono orgánico del octanol (0.608 kg/l).

En general, para todas las organohidrotalcitas la adsorción de los plaguicidas aumentó con la hidrofobicidad del plaguicida (Fig. IV.29). Este aumento fue prácticamente lineal, con la salvedad de que el fungicida metalaxil presentó una adsorción superior a la que cabría esperar a partir de su valor de  $K_{ow}$ , desviándose así del comportamiento del resto de los plaguicidas estudiados.

Por una parte, los resultados confirman que la hidrofobicidad parece ser la principal fuerza impulsora del proceso de adsorción de los plaguicidas a las organohidrotalcitas, pero también reflejan que la relación  $K_{oc}-K_{ow}$  depende de la organohidrotalcita considerada y, en particular, del número y tipo de dobles enlaces en la cadena alquílica del anión intercalado. Así, el hecho de que las pendientes de los ajustes lineales de la Fig. IV.29 para HT-DDS y HT-ELA sean mayores que 1 indica que el carbono orgánico de estas organohidrotalcitas tiene una mayor afinidad por los plaguicidas que el del octanol, mientras que las pendientes menores que 1 obtenidas para HT-OLE, HT-LINO y HT-LINOLEN indican que el carbono orgánico de estas organohidrotalcitas tiene una menor afinidad por los plaguicidas que el del octanol.

Estos resultados ilustran cómo pequeñas diferencias en la naturaleza química del anión modificador, tales como el grado y tipo de insaturaciones, puede dar lugar a importantes diferencias tanto en la estructura como en la capacidad adsorbente de las organohidrotalcitas, de forma que el contenido en carbono orgánico por sí sólo no es suficiente para predecir el rendimiento de estos materiales como adsorbentes de compuestos orgánicos.

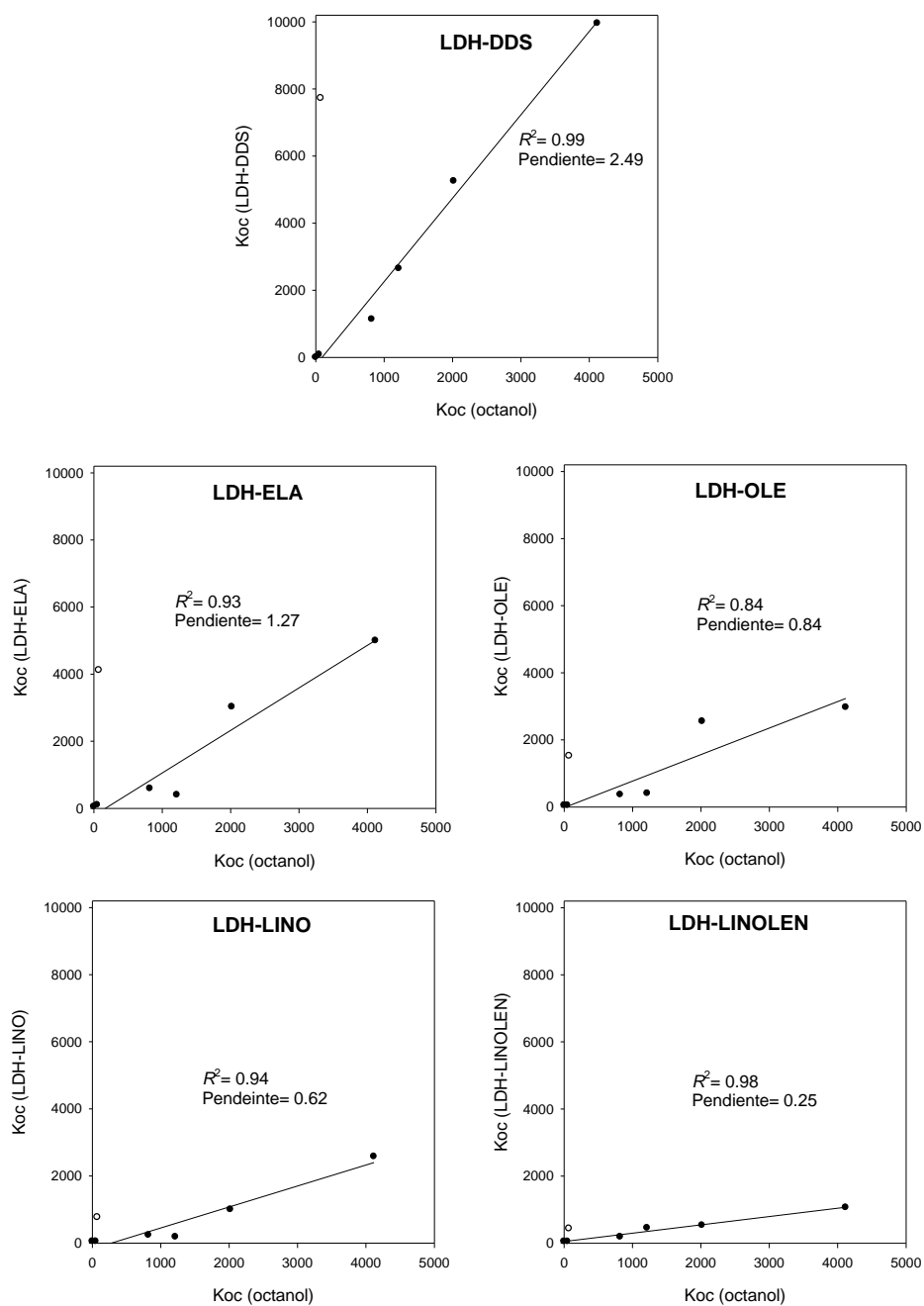


Fig. IV.29. Relación entre los valores  $K_{oc}$  experimentales obtenidos para la adsorción de varios pesticidas a las organohidrotalcitas y los coeficientes de partición octanol-agua de los pesticidas normalizados al contenido de carbono orgánico del octanol:  $K_{oc}(\text{octanol}) = K_{ow}/0.608$ . El fungicida metalaxil no está incluido en las regresiones.

**IV.3.2.2. Estudio de biodisponibilidad**

Para el estudio de biodisponibilidad se eligió la atrazina por disponer de bacterias adaptadas para su degradación (*Pseudomonas* sp., cepa ADP). En estudios previos, otros autores han utilizado la bacteria *Pseudomonas* sp., cepa ADP, para degradar este herbicida y remediar la contaminación producida por el mismo (Mandelbaum et al., 1995; Topp et al., 2000; Martinez et al., 2001). El objetivo de nuestro estudio fue evaluar cómo la presencia de organohidrotalcitas afectaba a la biodegradación del herbicida atrazina por las bacterias tanto en medio acuoso como en suelo.

En la Fig. IV.30 se representa el porcentaje de  $^{14}\text{C}$ -atrazina mineralizada en experimentos realizados con una disolución acuosa del herbicida en presencia de la hidrotalcita de partida ( $\text{HTCO}_3$ ) y de las distintas organohidrotalcitas sintetizadas para este capítulo, a distintos tiempos tras la adición de la bacteria *Pseudomonas* sp., cepa ADP. Con fines comparativos, se utilizó una muestra control (Blanco) en la que se puso en contacto únicamente la disolución de  $^{14}\text{C}$ -atrazina con las bacterias *Pseudomonas* sp. ADP.

Como muestra la Fig. IV.30, para la muestra control (Blanco) la atrazina fue rápidamente mineralizada por las bacterias, alcanzándose una tasa de mineralización del 80% a los dos días del comienzo del experimento. La presencia de los adsorbentes provocó una disminución de la velocidad y de la tasa de mineralización, que siguió el orden: BLANCO > HT-ELA  $\approx$  HT-LINOLEN > HT-OLE  $\approx$  HT-LINO >  $\text{HTCO}_3$  > HT-DDS.

Claramente todos los adsorbentes disminuyeron y/o retrasaron la mineralización del herbicida, aunque no se observó una relación directa entre la capacidad adsorbente de las muestras y su efecto en la mineralización. Así por ejemplo, la cantidad de atrazina mineralizada en presencia de la muestra de hidrotalcita original ( $\text{HTCO}_3$ ) fue de sólo un 30%, a pesar de que la adsorción de atrazina a esta muestra fue insignificante (Fig. IV.28, Tabla IV.10). Del mismo modo, la cantidad de atrazina mineralizada en presencia de la muestra HT-ELA fue muy elevada (70%), a pesar de ser una de las organohidrotalcitas que más afinidad presentó por la atrazina (Fig. IV.28, Tabla IV.10). En otros casos, la mineralización sí estuvo más acorde con una menor capacidad adsorbente de las muestras, como se observa, por ejemplo, para la secuencia de mineralización: HT-LINOLEN > HT-LINO  $\approx$  HT-OLE > HT-DDS. Estos resultados reflejan la complejidad del proceso de biodegradación y cómo éste puede verse influenciado por factores adicionales a la adsorción, como la cinética de desorción, la posible toxicidad/estimulación de los adsorbentes sobre los organismos degradadores o las interacciones organismo-adsorbente, que pueden afectar a la tasa de mineralización (Besse-Hoggan et al., 2009; Alekseeva et al., 2011). Por ejemplo, es posible que la baja tasa de mineralización encontrada en presencia de la hidrotalcita original ( $\text{HTCO}_3$ ) pueda ser debida a una interacción de las bacterias con las superficies cargadas positivamente de la hidrotalcita, que haya dificultado el contacto bacteria-

herbicida. En cualquier caso, nuestros resultados reflejan que es posible modular la biodisponibilidad del herbicida seleccionando adecuadamente las características del adsorbente utilizado. A grandes rasgos, se observa una elevada mineralización para el herbicida en ausencia de adsorbente, una mineralización intermedia en presencia de las organohidrotalcitas HT-ELA, HT-OLE, HT-LINO y HT-LINOLEN y una baja mineralización en presencia de la hidrotalcita original ( $\text{HTCO}_3$ ) y de la organohidrotalcita HT-DDS.

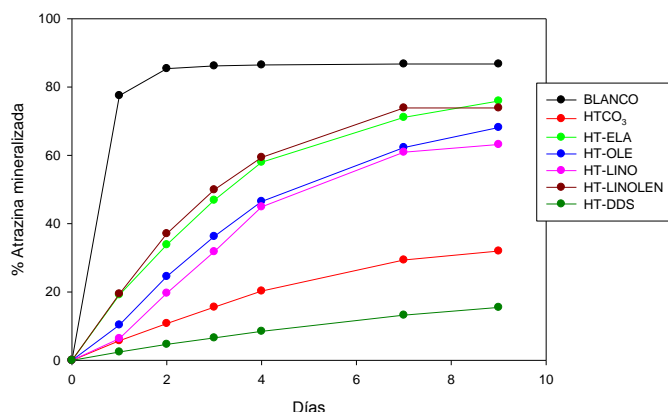


Fig. IV.30. Mineralización de la atrazina en medio acuoso por la bacteria *Pseudomonas* sp. ADP, en ausencia y en presencia de la hidrotalcita original y organohidrotalcitas.

Los datos obtenidos en medio acuoso se compararon con los obtenidos en un experimento similar realizado en presencia de suelo, llevado a cabo tal y como se describe en el apartado IV.2.2.5. En la Fig. IV.31 se representa el porcentaje de atrazina marcada con  $^{14}\text{C}$  mineralizada por las bacterias *Pseudomonas* sp. en el suelo, en ausencia y en presencia de los adsorbentes.

El comportamiento que se muestra en la Fig. IV.31 es similar al obtenido en ausencia de suelo, con la salvedad de un pequeño aumento generalizado de la tasa total de mineralización, si exceptuamos el descenso observado en presencia de la organohidrotalcita HT-LINO. De nuevo, las curvas pueden agruparse en tres grupos, con una elevada mineralización para el herbicida en ausencia de adsorbente, una mineralización intermedia en presencia de las organohidrotalcitas HT-ELA, HT-OLE y HT-LINOLEN y una baja mineralización en presencia de la hidrotalcita original ( $\text{HTCO}_3$ ) y las organohidrotalcitas HT-LINO y HT-DDS.

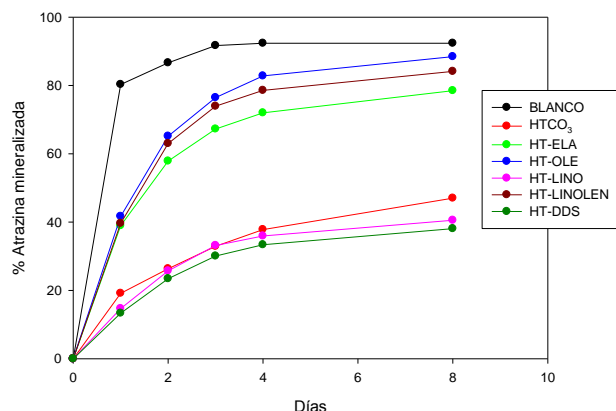


Fig. IV.31. Mineralización de la atrazina, en forma libre o en presencia de las distintas organohidrotalcitas, por la bacteria *Pseudomonas* sp. ADP en presencia del suelo 4.

A partir de los datos obtenidos, tras comprobar la alta eficiencia de adsorción de las organohidrotalcitas ante la atrazina y después de los resultados de biodisponibilidad obtenidos, puede concluirse que las organohidrotalcitas podrían ser unos buenos materiales capaces de restaurar suelos o aguas contaminadas por el herbicida, ya que serían capaces de adsorber en su interior la atrazina y, en presencia de *Pseudomonas* sp. ADP, se lograría una alta degradación del herbicida.

### IV.3.3. Aplicaciones relacionadas con la adsorción del fungicida metalaxil

Basándonos en los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se decidió seleccionar el metalaxil como ejemplo de plaguicida por el que las organohidrotalcitas podrían ser especialmente interesantes como adsorbentes y se desarrollaron experimentos dirigidos a profundizar en el estudio del proceso de adsorción-desorción de este fungicida y a ilustrar algunas posibles aplicaciones de las organohidrotalcitas como adsorbentes. A continuación se presentan los resultados de los distintos experimentos realizados.

#### IV.3.3.1. Estudios de adsorción-desorción en medio acuoso

##### IV.3.3.1.1. Efecto del pH en la estabilidad del metalaxil en disolución

El estudio del **efecto del pH** en la estabilidad del fungicida metalaxil se realizó debido a la conocida inestabilidad de este compuesto a valores de pH

alcalinos (Tomlin, 2006), próximos a los que suelen dar los materiales tipo hidrotalcita en suspensiones acuosas de los mismos. Se llevó a cabo preparando disoluciones de metalaxil de 1 mg/l a distintos valores de pH y determinando la disminución de la concentración del fungicida tras agitarlas 24 h en la oscuridad.

Los datos confirmaron la inestabilidad del fungicida a valores de pH alcalinos, sobre todo superiores a 11, para los que la degradación puede afectar al 50% del fungicida tras 24 h de agitación (Tabla IV.12). A valores de pH inferiores, la estabilidad del compuesto aumenta rápidamente alcanzando una tasa despreciable cuando el pH de equilibrio se sitúa por debajo de 9. La inestabilidad del metalaxil a elevados valores de pH puede explicarse por la hidrólisis del grupo éster y formación de metalaxil-ácido, que es uno de los principales productos de degradación de este pesticida.

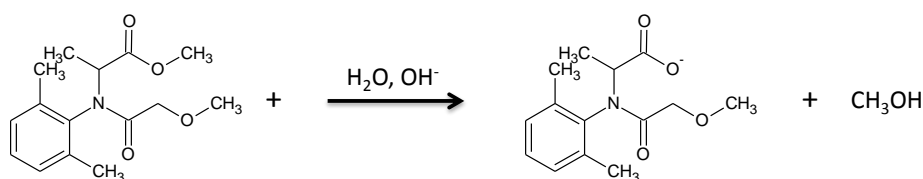


Fig. IV.32. Hidrólisis de metalaxil en medio básico

Esta prueba nos permite afirmar que gran parte de la disminución de la concentración de metalaxil observada en el estudio preliminar de adsorción con la muestra HT<sub>500</sub> (Fig. IV.28, Tabla IV.11) puede atribuirse a la degradación del fungicida al elevado pH al que da lugar esta muestra (10.6) debido al propio proceso de restructuración laminar (Pavlovic et al., 2005; Bruna et al., 2009), mientras que la degradación debió afectar en mucho menor grado a los resultados de adsorción obtenidos con las organohidrotalcitas, al ser el pH de equilibrio obtenido con estas muestras próximo a 9 (Tabla IV.11).

Tabla IV.12. Porcentaje de metalaxil degradado a partir de una disolución de concentración 1 mg/l agitada durante 24 h en oscuridad a diferentes valores de pH.

<b>pH inicial</b>	<b>pH final</b>	<b>% metalaxil degradado</b>
12.7	12.5	100%
12.4	12.3	100%
11.4	11.3	48%
10.8	10.3	7%
10.2	8.7	1%

#### IV.3.3.1.2. Cinética de adsorción

En la Fig. IV.33 se muestra el efecto del tiempo de contacto en la adsorción del metalaxil a las organohidrotalcitas HT-OLE y HT-ELA. Con fines comparativos se da también la cinética obtenida en presencia de la muestra HT<sub>500</sub>, que fue la base inorgánica utilizada para la preparación de las organohidrotalcitas.

Como se explicó en el apartado anterior, un pH alcalino puede provocar la degradación del fungicida metalaxil. Este efecto se apreció en la cinética de adsorción para la muestra HT<sub>500</sub> en la progresiva disminución con el tiempo de la concentración del fungicida sin que se alcanzase un equilibrio aparente. En cambio, para las dos organohidrotalcitas la adsorción del fungicida se produce rápidamente, alcanzándose el equilibrio en las primeras horas de contacto. Tal y como se observó en el estudio preliminar de adsorción (apartado IV.3.2.1), la cantidad final de metalaxil adsorbido por la muestra HT-ELA fue superior a la adsorbida por la muestra HT-OLE (Fig. IV.33).

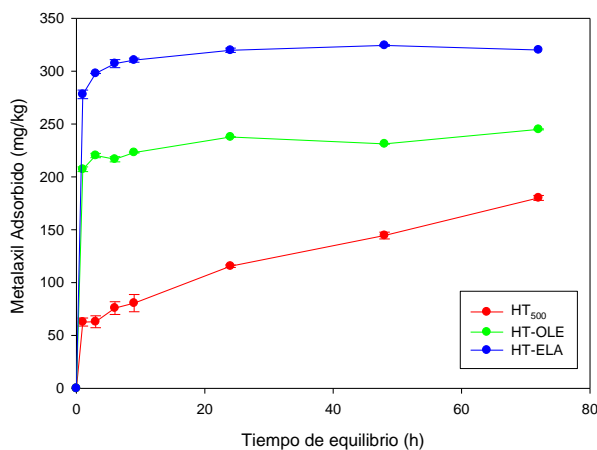


Fig. IV.33. Cinética de adsorción del metalaxil a las muestras HT<sub>500</sub>, HT-ELA y HT-OLE.

#### IV.3.3.1.3. Isotermas de adsorción y estudio de la desorción

Las **isotermas de adsorción** del metalaxil, que reflejan el efecto de la concentración en la adsorción del fungicida, están representadas en la Fig. IV.34. Se midieron sobre la muestra de hidrotalcita original (HTCO<sub>3</sub>) y sobre la organohidrotalcitas HT-ELA y HT-OLE en un intervalo de concentraciones iniciales del fungicida que varió entre 0.1 y 600 mg/l y se ajustaron a la ecuación de Freundlich, cuyos parámetros se incluyen en la Tabla IV.13.

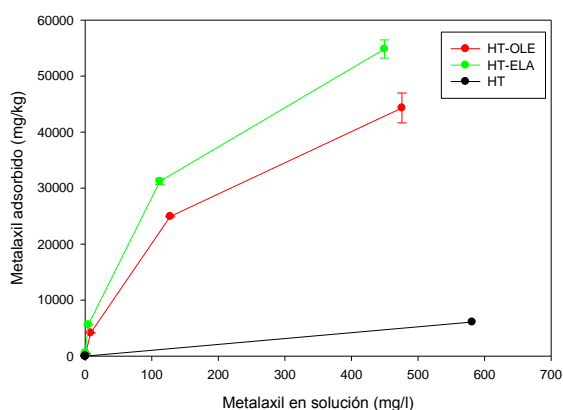


Fig. IV.34. Isotermas de adsorción de metalaxil a las muestras HTCO<sub>3</sub>, HT-OLE y HT-ELA.

Tabla IV.13. Constantes de Freundlich para la adsorción de metalaxil a las organohidrotalcitas seleccionadas.

Muestras	K <sub>f</sub>	N <sub>f</sub>	R <sup>2</sup>
HT-ELA	923(891-955)	0.75 (0.74-0.76)	0.98
HT-OLE	438 (398-479)	0.82 (0.80-0.84)	0.98

Las isotermas reflejan una baja afinidad del metalaxil por la hidrotalcita original y una elevada afinidad por las organohidrotalcitas, que se mantiene hasta elevadas concentraciones de fungicida. Las isotermas se ajustaron bien a la ecuación de Freundlich, con valores del coeficiente N<sub>f</sub> inferiores a la unidad que reflejan isotermas del tipo L, según la clasificación de Giles et al. (1960).

Tras la adsorción, se llevó a cabo el estudio de la **desorción** del fungicida. Para ello, se determinó el porcentaje desorbido del producto de adsorción resultante del punto de la isoterma correspondiente a una concentración inicial de 1 y 600 mg/l, tras extracciones con agua, metanol y HCl 37%. La Fig. IV.35 muestra los resultados obtenidos para el punto de 1 mg/l, que fueron muy similares a los obtenidos a partir del punto de concentración de 600 mg/l. En el caso de las organohidrotalcitas, cuando se utilizó agua la desorción del metalaxil se produjo lentamente, mientras que el metanol y HCl



fueron capaces de recuperar la mayor parte del metalaxil preadsorbido en las organohidrotalcitas (Fig. IV.35). La eficacia del metanol se debe a su carácter orgánico y solubilizador de pesticidas, mientras que el HCl es capaz de destruir las láminas de hidrotalcita con la consiguiente liberación al medio del anión orgánico y del pesticida adsorbido. En el caso de la muestra HT<sub>500</sub>, la nula recuperación de fungicida con los distintos extractantes confirma su degradación durante la etapa de adsorción. Es de destacar que la pequeña cantidad de metalaxil no extraíble observada en el caso de las organohidrotalcitas (< 20%) también podría corresponder a una pequeña cantidad de compuesto degradado en el transcurso de los experimentos.

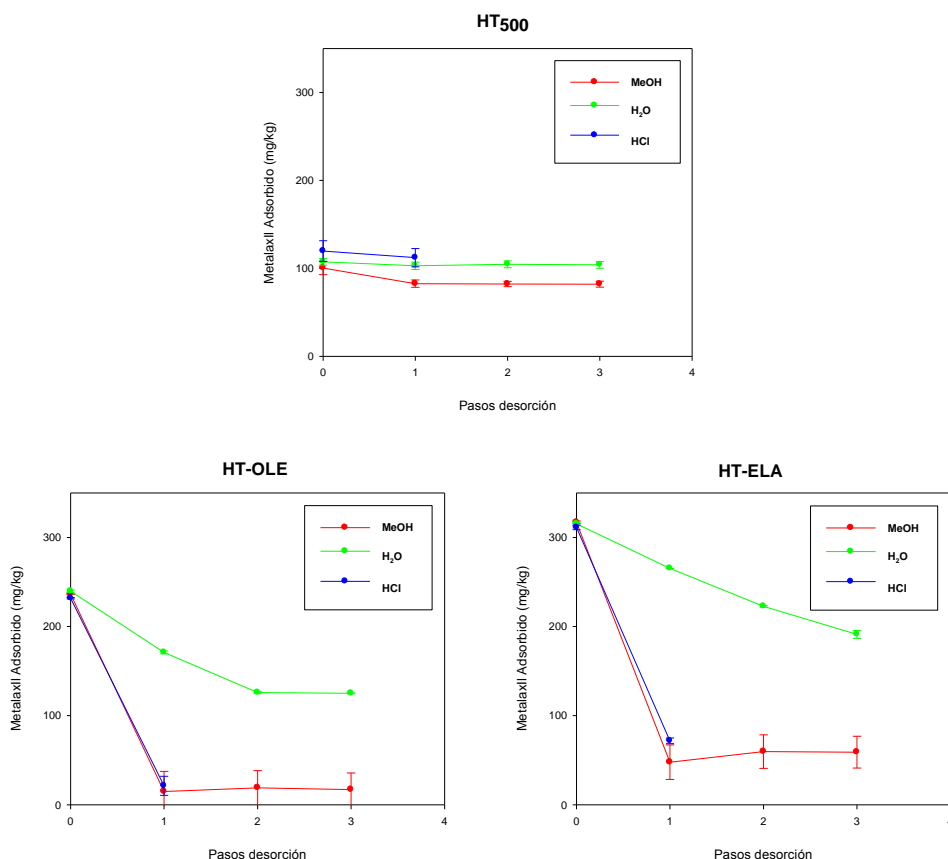


Fig. IV.35. Desorción del metalaxil (1 mg/l) de las muestras HT<sub>500</sub>, HT-ELA y HT-OLE tras diluciones sucesivas con agua, metanol y HCl 37%.

### **IV.3.3.2. Estudios de adsorción en suelos enmendados**

Para estos experimentos se decidió seleccionar las dos organohidrotalcitas con mayor afinidad por el metalaxil (HT-ELA y HT-OLE), que fueron utilizadas como enmiendas de distintos suelos para evaluar su capacidad de inmovilización del fungicida. Los suelos que se utilizaron fueron los suelos 1, 2 y 3 (Tabla IV.2) enmendados al 0%, 5% y 10% con cada una de las organohidrotalcitas.

En la Tabla IV.14 puede observarse cómo la adición de HT-ELA y HT-OLE al suelo ácido (suelo 1) provocó un aumento significativo en la cantidad de metalaxil adsorbido, siendo la muestra HT-ELA al 10% la que mayor incremento produjo, en consonancia con su elevada afinidad por el fungicida.

El incremento en la adsorción provocado por la adición de las organohidrotalcitas fue incluso más pronunciado cuando éstas se aplicaron a los suelos alcalinos 2 y 3, con porcentajes de adsorción que llegaron hasta el 90% (Tabla IV.14). Es posible que el bajo pH del suelo 1 haya podido provocar una cierta disolución de las láminas de hidrotalcita, reduciendo la eficacia de la enmienda como adsorbente del fungicida.

Tabla IV.14. Resultados de adsorción de metalaxil en suelos sin enmendar y enmendados a diferentes porcentajes con organohidrotalcitas. La concentración inicial de metalaxil fue de 1 mg/l y la relación suelo:disolución fue 0.5 g:8 ml.

<b>Muestras</b>	<b>pH inic</b>	<b>pH eq</b>	<b>% Ads</b>
Suelo 1	6.2	4.8 ± 0.1	11.8 ± 1.9
Suelo 1 + HT-OLE (5%)	6.2	6.7 ± 0.2	26.9 ± 0.1
Suelo 1 + HT-OLE (10%)	6.2	7.5 ± 0.1	45.6 ± 0.1
Suelo 1 + HT-ELA (5%)	6.2	6.8 ± 0.4	40.2 ± 0.5
Suelo 1 + HT-ELA (10%)	6.2	7.6 ± 0.1	63.4 ± 0.5
Suelo 2	6.2	7.8 ± 0.1	3.9 ± 0.1
Suelo 2 + HT-OLE (5%)	6.2	8.5 ± 0.1	70.5 ± 0.5
Suelo 2 + HT-OLE (10%)	6.2	8.6 ± 0.2	81.9 ± 0.4
Suelo 2 + HT-ELA (5%)	6.2	8.0 ± 0.1	82.7 ± 0.3
Suelo 2 + HT-ELA (10%)	6.2	8.1 ± 0.1	89.4 ± 0.4
Suelo 3	6.2	8.0 ± 0.1	4.8 ± 0.1
Suelo 3 + HT-OLE (5%)	6.2	7.6 ± 0.1	77.7 ± 0.1
Suelo 3 + HT-OLE (10%)	6.2	8.5 ± 0.3	85.9 ± 0.1
Suelo 3 + HT-ELA (5%)	6.2	8.1 ± 0.1	81.0 ± 0.6
Suelo 3 + HT-ELA (10%)	6.2	8.2 ± 0.1	89.9 ± 0.5

De acuerdo con los resultados anteriores, la Fig. IV.36 muestra cómo los coeficientes de distribución ( $K_d$ ) para la adsorción del metalaxil a los suelos aumentan con la dosis de HT-ELA y HT-OLE aplicada y cómo dicho aumento es mucho más pronunciado en los suelos alcalinos 2 y 3 que en suelo ácido 1 (Fig. IV.36).

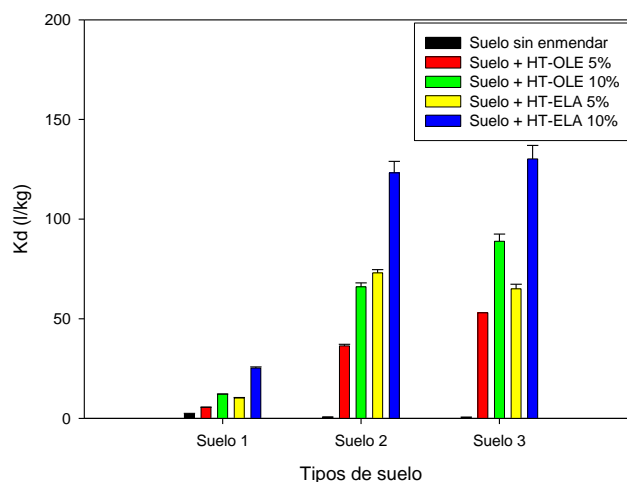


Fig. IV.36. Coeficientes de distribución de metalaxil en distintos suelos sin enmendar y enmendados con las organohidrotalcitas HT-OLE y HT-ELA.

#### IV.3.3.3. Evaluación de las organohidrotalcitas como soportes para la liberación lenta del fungicida

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en los experimentos planteados para la evaluación de la capacidad de las organohidrotalcitas de actuar como soportes del fungicida metalaxil para una liberación lenta del mismo. En primer lugar, se prepararon formulaciones de las organohidrotalcitas con metalaxil adsorbido y, posteriormente, se estudió la liberación del fungicida en agua y su lixiviación en columnas de suelo, comparando los resultados con los obtenidos para el fungicida libre no soportado.

##### IV.3.3.3.1. Características de las formulaciones

Para la síntesis de las formulaciones organohidrotalcita-metalaxil se eligieron las dos muestras que presentaron mayor afinidad por el fungicida: HT-ELA y HT-OLE. Estas muestras se pusieron en contacto con una disolución de metalaxil de 600 mg/l, tras lo cual se filtró al vacío para recuperar el complejo organohidrotalcita-metalaxil, según se describe en el apartado IV.2.2.6.3.1.

La cantidad final de metalaxil adsorbido en las formulaciones se calculó de forma indirecta, a partir de la cantidad no adsorbida, y también directamente mediante extracción del fungicida con metanol. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla IV.15.

Tabla IV.15. Contenido de metalaxil en los complejos organohidrotalcita-metalaxil

Complejos	% Metalaxil (método indirecto)	% Metalaxil (método directo)
HT-ELA-metalaxil	6.0	5.6
HT-OLE-metalaxil	4.3	4.4

Los contenidos en metalaxil obtenidos a partir de los dos métodos, como puede observarse, fueron muy similares, tomándose los porcentajes obtenidos por el método directo para el resto de los experimentos por su mayor precisión.

### IV.3.3.3.2. Estudio de la liberación en agua del fungicida

En la Fig. IV.37 se representan las cinéticas de liberación en agua del fungicida metalaxil a partir de las dos formulaciones preparadas: HT-ELA-metalaxil y HT-OLE-metalaxil.

Tras el análisis de las distintas alícuotas recogidas a distintos tiempos después de suspender las formulaciones en agua, se analizó la concentración de fungicida en disolución por HPLC. Como se muestra en la Fig. IV.37, una fracción de aproximadamente el 50% del fungicida se libera de forma casi instantánea de las formulaciones, existiendo otra fracción que se libera más lentamente. Las dos formulaciones utilizadas se comportaron de manera muy similar, de modo que, bajo las condiciones experimentales de baja relación sólido:disolución empleadas, el equilibrio de liberación se alcanzó en ambos casos a las 24 h de experimento. Bajo unas condiciones de campo de menor humedad, es de esperar que las formulaciones liberen el producto fitosanitario a una velocidad significativamente menor de lo que lo haría una formulación convencional con la materia activa en una forma inmediatamente disponible.

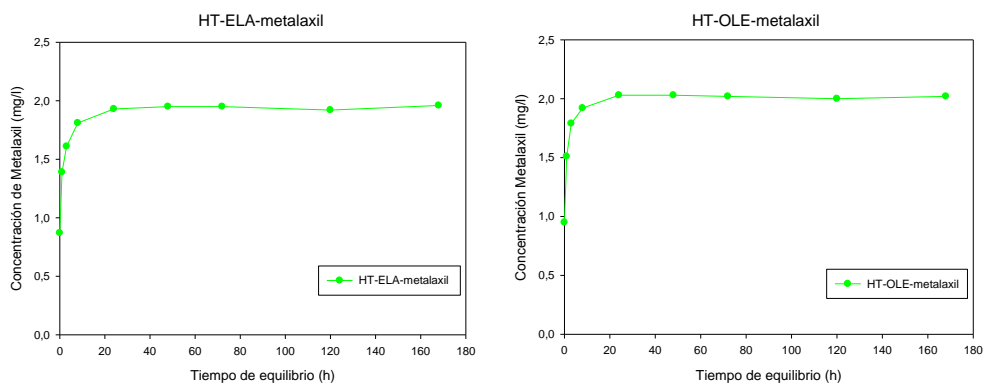


Fig. IV.37. Cinéticas de liberación en agua del fungicida metalaxil soportado en las organohidrotalcitas HT-ELA y HT-OLE.

#### IV.3.3.3.3. Estudio de lixiviación

En este apartado se discuten las curvas de lixiviación de metalaxil obtenidas en columnas de suelos 1 y 3 (Tabla IV.3), tras haberles aplicado el fungicida bien en forma libre (disuelto en agua), bien soportado en forma de complejos organohidrotalcita-fungicida (HT-ELA-metalaxil y HT-OLE-metalaxil). La aplicación de las formulaciones para los dos suelos se realizó de dos formas distintas: directamente en superficie y enterrando la formulación a 1 cm de profundidad, como se ilustra en la Fig. IV.10.

Además de estudiar la influencia del tipo de suelo y del tipo y modo de aplicación de la formulación en la movilidad del metalaxil, el estudio de lixiviación se completó: 1) llevando a cabo un análisis enantioselectivo de los lixiviados para determinar de forma independiente el movimiento a través de las columnas de los dos enantiómeros que constituyen la mezcla racémica del fungicida y 2) determinando los cambios en las curvas de lixiviación tras tres aplicaciones consecutivas del fungicida a las columnas.

##### A) Efecto del tipo de formulación en dos suelos

En la Fig. IV.38 se muestran las curvas de lixiviación relativas y acumuladas del fungicida metalaxil tras aplicarlo en superficie a columnas de los suelos 1 y 3 en forma libre (disuelto en agua) y como formulaciones HT-OLE-metalaxil y HT-ELA-metalaxil.

Lo primero que se observa es una marcada diferencia en las curvas de lixiviación dependiendo del suelo considerado. Para el suelo 1, las curvas son mucho más achatadas y el fungicida aparece a mayores volúmenes de agua añadida que en el caso del suelo 3. Además, las cantidades totales lixiviadas

fueron menores para el suelo 1 (50-60%) que para el suelo 3 (60-90%). Este diferente comportamiento en los suelos 1 y 3 puede atribuirse al mayor contenido en materia orgánica del suelo 1 (Tabla IV.3) que ha podido favorecer los procesos de adsorción y degradación del fungicida durante su lixiviación a través de la columna, explicando así las diferentes curvas de lixiviación obtenidas.

En comparación con la aplicación del fungicida libre disuelto en agua, la aplicación del metalaxil soportado en las organohidrotalcitas acentuó el achatamiento de las curvas y retrasó la lixiviación del fungicida, sobre todo en el suelo 3 (Fig. IV.38). Este efecto se puede atribuir a la liberación progresiva del producto fitosanitario a partir de las formulaciones de organohidrotalcita, tal y como indican las cinéticas de liberación en agua representadas en la Fig. IV.37. El efecto fue mucho más pronunciado en el caso del suelo alcalino (suelo 3) que en el del suelo ácido (suelo 1) porque es probable que el pH ácido del suelo 1 alterara la estructura de las láminas de la hidrotalcita, provocando una rápida liberación al medio del fungicida preadsorbido, haciendo que éste tuviera un comportamiento parecido al del fungicida libre (Fig. IV.38A y C). El comportamiento del metalaxil en el suelo alcalino (suelo 3) repercutió también en la cantidad total lixiviada, que se redujo entre un 20 y un 30% tras aplicar el fungicida como formulaciones de organohidrotalcitas, bien por la existencia de una parte del fungicida fuertemente retenida por las formulaciones o por una mayor incidencia de los procesos degradativos, al permanecer más tiempo el fungicida en las columnas de suelo (Fig. IV.38D) (Bruna et al., 2008).

El retraso observado en la movilidad del fungicida metalaxil al aplicarlo como formulación de organohidrotalcita, sobre todo en el suelo alcalino, favorecerá que el fungicida se mantenga más tiempo en zona radicular y que se libere gradualmente ante el organismo diana ante el cual debe actuar, reduciendo pérdidas del producto y prolongando su eficacia.

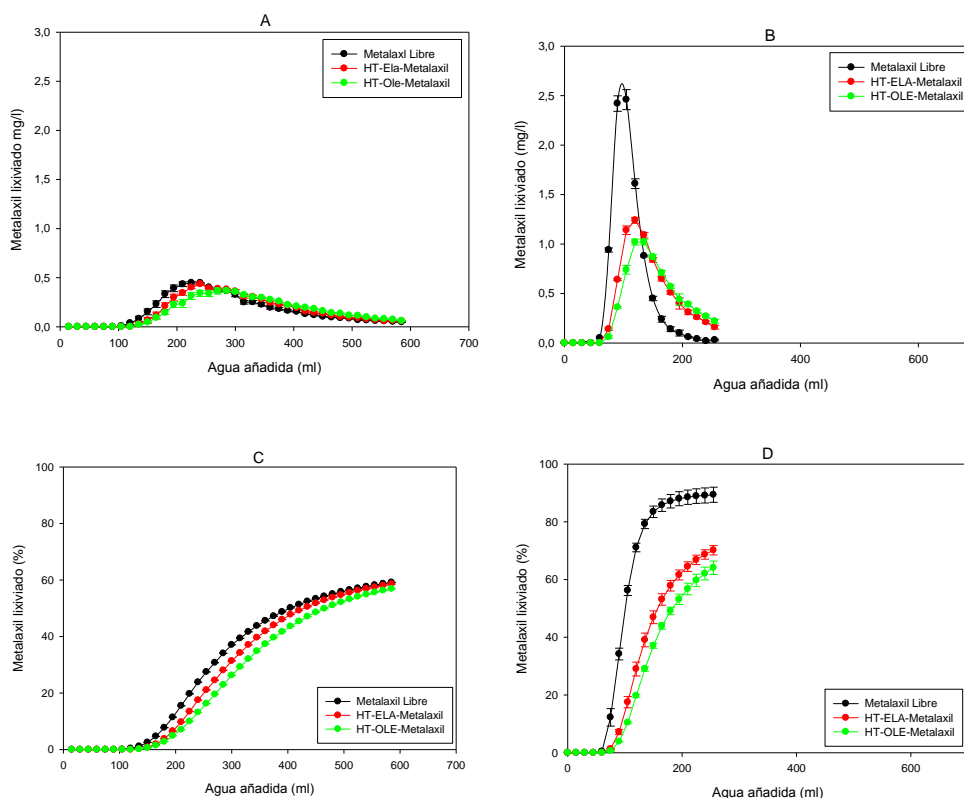


Fig. IV.38. Curvas de elución relativas (A y B) y acumuladas (C y D) del metalaxil libre y de los complejos HT-ELA-metalaxil y HT-OLE-metalaxil en el suelo 1 (A y C) y en el suelo 3 (B y D), con aplicación de los complejos en superficie

#### B) Efecto de la forma de aplicación

Tal y como se hizo con el herbicida clopiralida en el capítulo anterior, se quiso comprobar cómo afectaba la forma de aplicación de la formulación al suelo en las curvas de lixiviación del fungicida metalaxil. Para ello se seleccionó el suelo 3, al cual se aplicaron las formulaciones de dos formas distintas: en superficie y enterrándolas a un centímetro de profundidad.

En la Fig. IV.39 se comparan las curvas de elución relativas (a) y acumuladas (b) de la forma libre y de las formulaciones aplicadas en superficie y enterradas. Si comparamos el comportamiento de las formulaciones con respecto a la forma de aplicación, podemos ver diferencias significativas. Las formulaciones enterradas retrasan y reducen la lixiviación del metalaxil respecto a la aplicación del fungicida libre, pero en menor medida que en el caso de la aplicación en superficie. Es posible que un mayor contacto de las formulaciones con la matriz del suelo haya podido favorecer el desplazamiento del fungicida

adsorbido en las organohidrotalcitas por los componentes solubles del suelo acelerando la liberación.

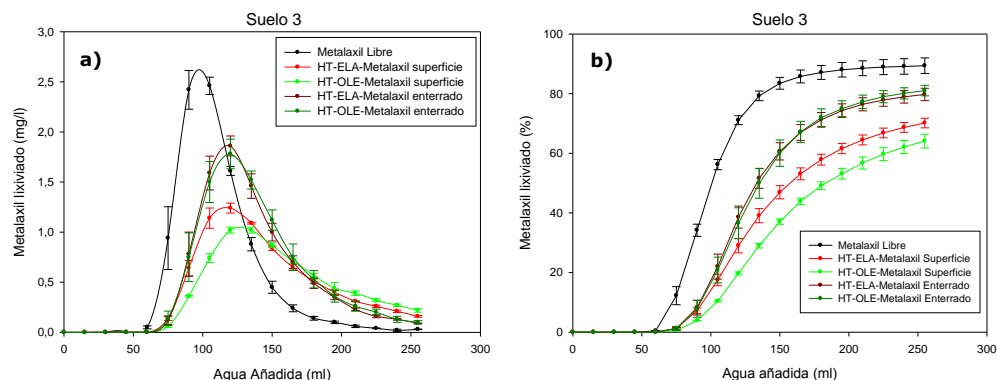


Fig. IV.39. Curvas de elución relativas (a) y acumuladas (b) del metalaxil libre y de los complejos HT-ELA-metalaxil y HT-OLE-metalaxil en el suelo 3, para las distintas formas de aplicación de las formulaciones: en superficie y enterradas.

#### C) Estudio enantioselectivo de la lixiviación

El metalaxil es un compuesto quiral que, en su forma racémica como la utilizada en nuestro estudio, existe como una mezcla al 50% de dos enantiómeros, metalaxil-*R* y metalaxil-*S*, siendo el enantiómero *R* el principal responsable de su actividad biológica (Buerge et al., 2003; Chen y Liu, 2009). En estudios previos se ha demostrado que la degradación que sufre el metalaxil en el suelo es enantioselectiva y que dicha enantioselectividad depende del tipo de suelo (Buser et al., 2002; Buerge et al., 2003.; Chen y Liu, 2009; Celis et al., 2013). El enantiómero metalaxil-*S* se degrada con mayor rapidez que el metalaxil-*R* en suelos cuyo pH es inferior a 4, el enantiómero *R* se degrada con mayor rapidez que el *S* en suelos con pH mayor a 5 y los dos enantiómeros tienen una tasa de degradación parecida en suelos con pH entre 4 y 5 (Buerge et al., 2003).

Por otra parte, nos encontramos que no había bibliografía publicada sobre la enantioselectividad del proceso de lixiviación del metalaxil en suelos, a pesar de que una diferente tasa de degradación de los dos enantiómeros del metalaxil debe repercutir en la cantidad lixiviada de cada enantiómero. Por esta razón, se realizó un análisis enantioselectivo adicional de los lixiviados recogidos de las columnas de suelo 1 y 3, utilizando una columna cromatográfica quiral, capaz de diferenciar las concentraciones de metalaxil-*R* y metalaxil-*S* en los mismos.



En las Figs. IV.40 y IV.41 se muestran las curvas de lixiviación relativas y acumuladas para el metalaxil libre y para las formulaciones HT-ELA-metalaxil y HT-OLE-metalaxil en las columnas del suelo 1 y del suelo 3, representándose separadamente los resultados de lixiviación de los dos enantiómeros del metalaxil, *R* y *S*, así como la suma de ambos (*R*+*S*) con fines comparativos. Las curvas relativas muestran las concentraciones en los lixiviados, mientras que las acumuladas expresan cantidades totales lixivias respecto a la aplicada.

En el suelo 1, tanto para la aplicación del metalaxil libre como en forma de formulaciones basadas en organohidrotalcitas, la lixiviación de los dos enantiómeros fue muy similar, es decir, presentó escasa enantioselectividad (Fig. IV.40). En cambio, en el suelo 3 la lixiviación del metalaxil resultó ser enantioselectiva: las concentraciones de enantiómero *S* en los lixiviados fueron, por lo general, superiores a las concentraciones de enantiómero *R*. Para ambos suelos, la suma de las concentraciones de los dos enantiómeros estuvo de acuerdo con la obtenida a partir del análisis no enantioselectivo de los lixiviados usando la columna cromatográfica aquiral.

Los resultados del análisis enantioselectivo de los lixiviados confirman, por tanto, el comportamiento previsto en suelos con diferentes pH (Buerge et al., 2003). El pH del suelo 1 está en el rango de 4-5 en el que los dos enantiómeros del metalaxil se degradan a una velocidad similar, lo que da lugar a similares concentraciones de los dos enantiómeros en los lixiviados. El pH del suelo 3 es alcalino y favorece la degradación del enantiómero *R*, que es el responsable de la actividad biológica del fungicida, de manera que éste aparece en concentraciones más bajas que las del enantiómero *S* en los lixiviados. Este comportamiento, que se mantiene tanto para la aplicación del fungicida en forma libre como en forma de formulaciones con las organohidrotalcitas, indica que en suelos alcalinos es de esperar una mayor lixiviación del enantiómero *S* del metalaxil, como consecuencia de una mayor persistencia, y por consiguiente, un mayor riesgo de contaminación de aguas subterráneas por este estereoisómero.

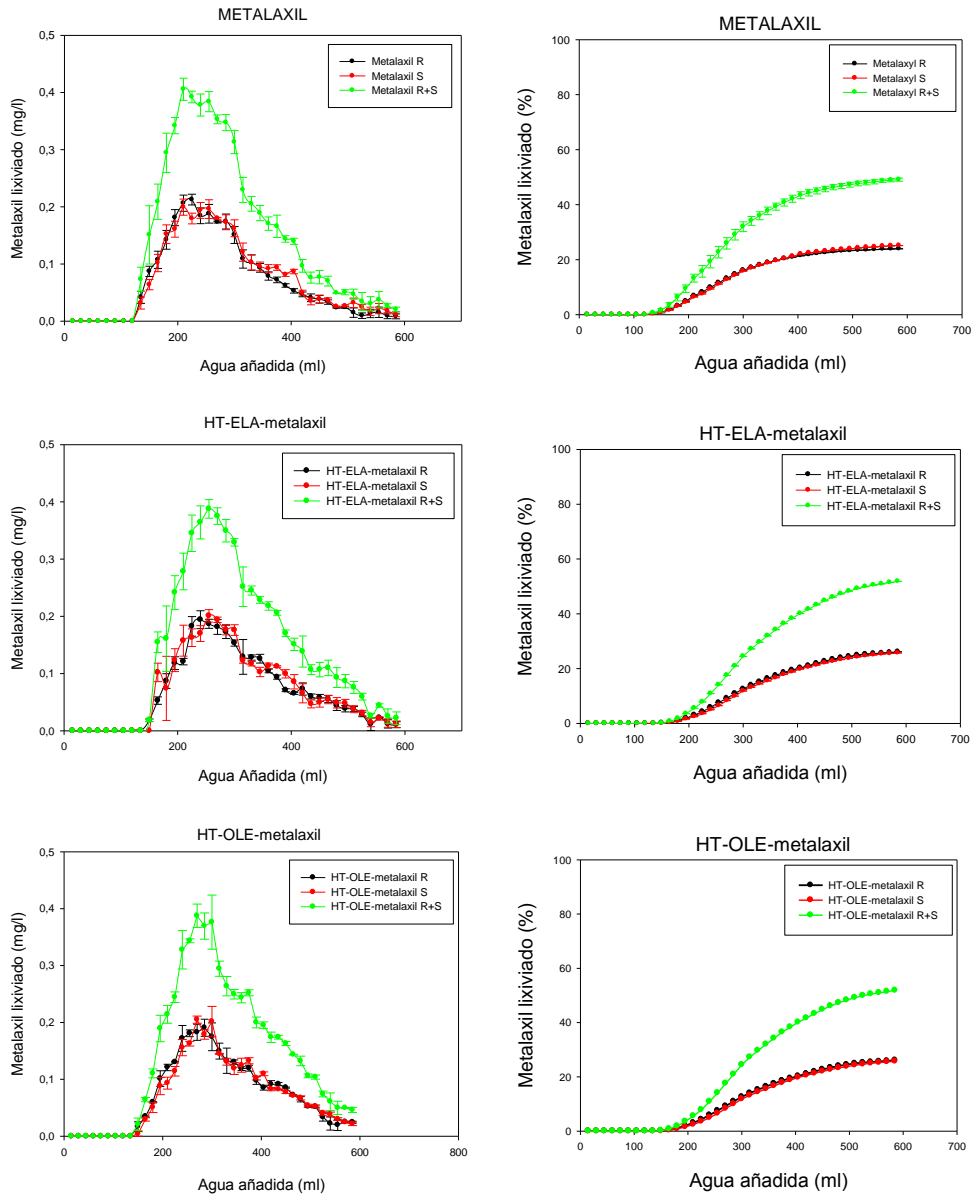


Fig. IV.40. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para metalaxil aplicado a columnas de suelo 1 en forma libre y como formulaciones de organohidrotalcitas (HT-ELA-metalaxil y HT-OLE-metalaxil) con análisis enantioselectivo de los lixiviados.

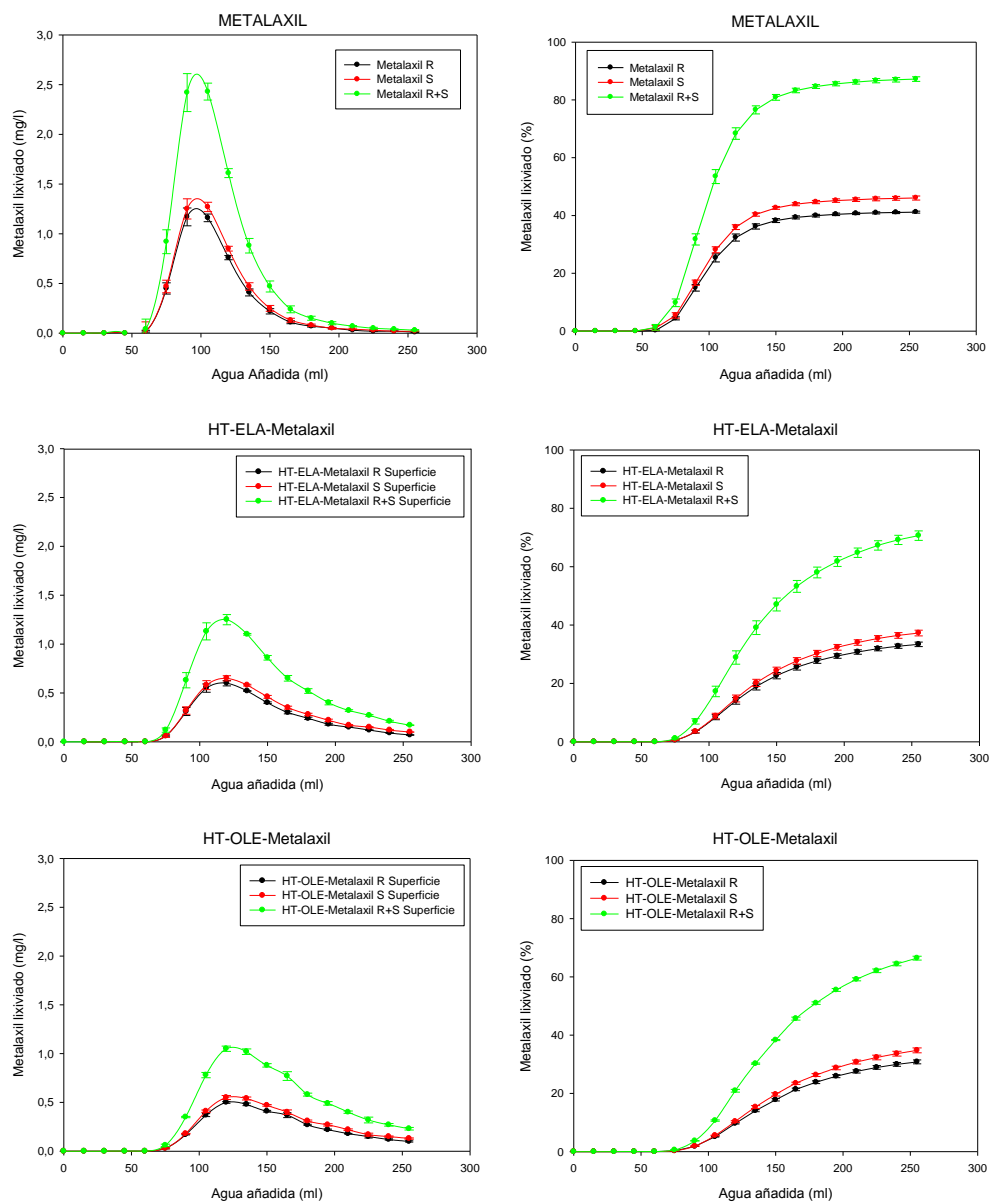


Fig. IV.41. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para metalaxil aplicado a columnas de suelo 3 en forma libre y como formulaciones de organohidrotalcitas (HT-ELA-metalaxil y HT-OLE-metalaxil) con análisis enantioselectivo de los lixiviados.

D) Efecto de las aplicaciones repetidas

Para las columnas del suelo 3, una vez finalizado el estudio de lixiviación del metalaxil aplicado en superficie en forma libre y como formulaciones HT-ELA-metalaxil y HT-OLE-metalaxil, se decidió realizar dos aplicaciones adicionales a las columnas previamente tratadas con el fungicida con la finalidad de evaluar posibles cambios en la lixiviación bajo aplicaciones repetidas del producto fitosanitario a un mismo suelo.

En las Fig. IV.42 y IV.43 se comparan los resultados obtenidos para las tres aplicaciones consecutivas del metalaxil libre y de las dos formulaciones de organohidrotalcita, tanto utilizando la columna cromatográfica aquiral (C18) como la quiral para el análisis de los lixiviados. De este modo, se han representado las curvas de lixiviación de los enantiomeros R y S por separado, la suma de ambos (R+S) y los resultados obtenidos con la columna aquiral (C18 ó NQ).

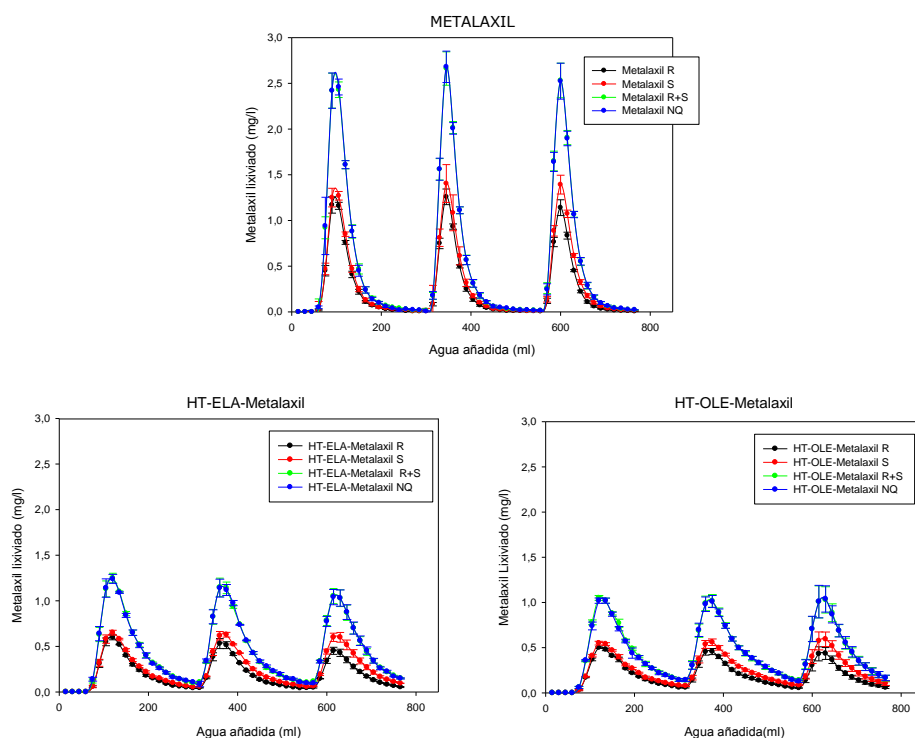


Fig. IV.42. Curvas de elución relativas para metalaxil libre y para las dos formulaciones (HT-ELA-metalaxil y HT-OLE-metalaxil) con aplicación repetida en superficie a columnas del suelo 3, con análisis enantioselectivo y no enantioselectivo (NQ) de los lixiviados.

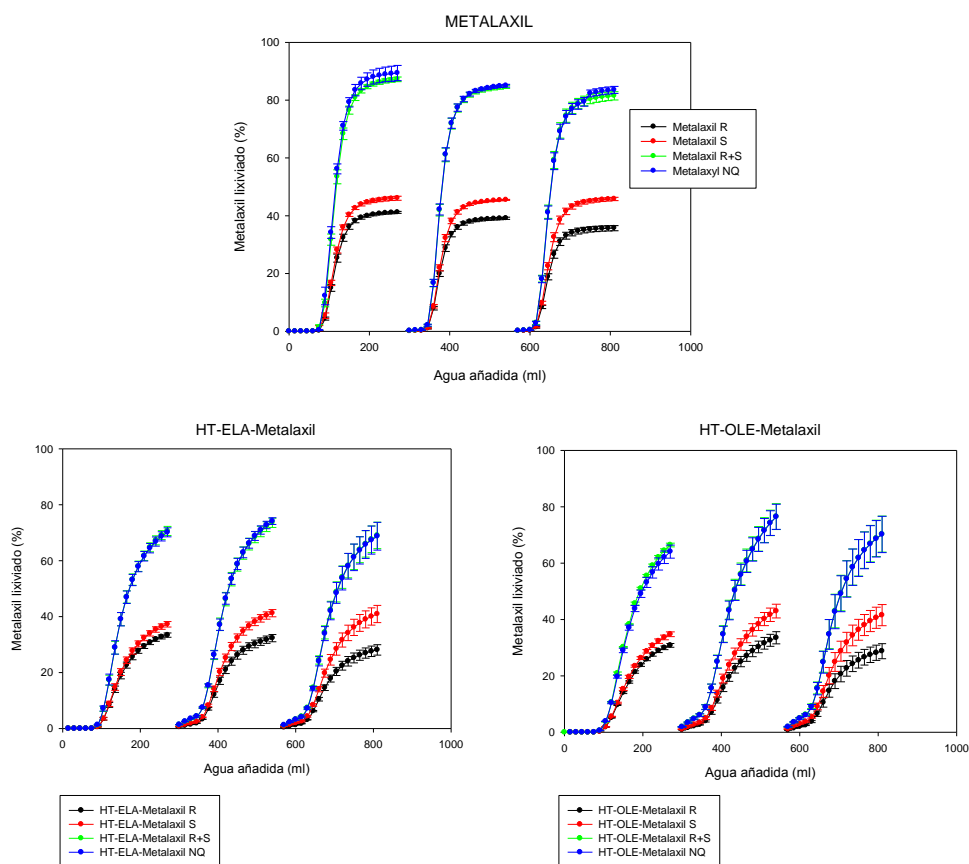


Fig. IV.43. Curvas de elución acumuladas del metalaxil libre y las dos formulaciones (HT-ELA-metalaxil y HT-OLE-metalaxil) con aplicación repetida en superficie a columnas del suelo 3, con análisis enantioselectivo y no enantioselectivo (NQ) de los lixiviados.

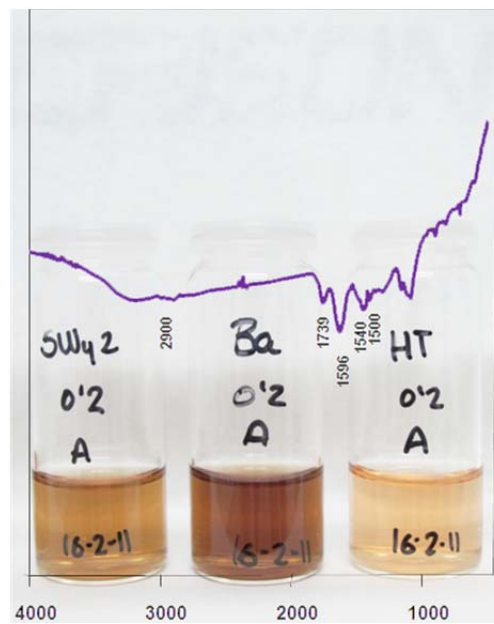
Para las tres aplicaciones consecutivas realizadas, las curvas de elución relativas y acumuladas obtenidas fueron muy similares. No obstante, un análisis detallado de las curvas resultantes del análisis enantioselectivo de los lixiviados reveló que mientras que las concentraciones relativas y acumuladas de *S*-metalaxil se mantuvieron para las tres aplicaciones consecutivas, las de *R*-metalaxil se fueron reduciendo a medida que aumentó el número de aplicaciones (Fig. IV.42 y IV.43). Como consecuencia, la diferencia entre las cantidades lixiviadas de *S*- y *R*-metalaxil se fue haciendo más pronunciada con el número de aplicaciones realizadas. Este comportamiento apunta a una degradación cada vez más rápida del enantiómero activo del metalaxil (*R*) por su aplicación repetida a suelos alcalinos, lo que podría repercutir en una menor eficacia biológica del producto y a un mayor riesgo de contaminación de aguas

subterráneas por el enantiómero *S*, sin actividad biológica. En este sentido, la aplicación del fungicida como formulación basada en organohidrotalcitas, aunque no parece evitar dicha degradación preferente del enantiómero *R*, sí podría retrasar el proceso de lixiviación del enantiómero *S*, particularmente susceptible de alcanzar aguas subterráneas.

### IV.4. CONSIDERACIONES FINALES

- Se consiguió intercalar con facilidad los aniones de ácidos grasos insaturados (ELA, OLE, LINO y LINOLEN) en una hidrotalcita Mg/Al (3:1) mediante el proceso de reconstrucción de la estructura laminar de la hidrotalcita a partir de su producto calcinado en disoluciones acuosas de los correspondientes ácidos en sus formas aniónicas.
- La caracterización de las organohidrotalcitas por análisis elemental, XRD, FT-IR, SEM y TEM y medidas de potencial Z confirma la intercalación de los ácidos grasos insaturados en sus formas aniónicas en el espacio interlaminar de la hidrotalcita y permitió proponer posibles disposiciones de los aniones orgánicos en la interlámina. La presencia de uno o varios enlaces en configuración *cis* en el ácido graso determinó en gran medida la disposición de éste en la interlámina y la estabilidad de la organohidrotalcita resultante.
- Las medidas de adsorción de diferentes plaguicidas en las diversas organohidrotalcitas preparadas a partir de los ácidos grasos insaturados muestran que la adsorción depende de la naturaleza del plaguicida y del ácido graso utilizado para la modificación de la hidrotalcita. Los datos indicaron que las interacciones hidrofóbicas fueron la principal fuerza impulsora del proceso de adsorción; para la mayoría de los plaguicidas la adsorción a las organohidrotalcitas siguió el orden: HT-DDS > HT-ELA > HT-OLE > HT-LINO > HT-LINOLEN.
- Estudios de biodisponibilidad demostraron que las organohidrotalcitas podían ser materiales útiles para restaurar suelos y aguas contaminadas por el herbicida atrazina, ya que retenían el herbicida manteniendo una elevada biodisponibilidad del mismo, lo que permitiría su mineralización por bacterias degradadoras específicas.
- En estudios de adsorción del fungicida metalaxil a las organohidrotalcitas se comprobó que el proceso de adsorción fue rápido y reversible y que las organohidrotalcitas podrían ser útiles como enmendantes para aumentar la retención del fungicida en suelos, sobre todo en el caso de suelos alcalinos para evitar la disolución parcial del adsorbente que suele tener lugar en medios ácidos.

➤ Los estudios de lixiviación ilustraron cómo la aplicación del fungicida metalaxil soportado en organohidrotalcitas (HT-ELA-metalaxil y HT-OLE-metalaxil), puede ayudar a reducir la lixiviación del fungicida en suelos con escasa capacidad de retención. El modo de aplicación de la formulación (en superficie o enterrada) y el pH del suelo influyeron en el patrón de lixiviación de los dos enantiómeros que constituyen la mezcla racémica del fungicida y las aplicaciones repetidas del fungicida a un mismo suelo (alcalino) promovieron una degradación cada vez más rápida del enantiómero activo del metalaxil (*R*), lo que reduciría la eficacia biológica del producto y aumentaría el riesgo de contaminación de aguas subterráneas por el enantiómero *S*, sin actividad biológica. Las formulaciones, aunque no parecen evitar la degradación acelerada del metalaxil tras aplicaciones sucesivas a suelos alcalinos, sí podrían ayudar a reducir la lixiviación del enantiómero *S*, particularmente susceptible de alcanzar aguas subterráneas debido a su mayor persistencia.



## V. Sistemas Arcillas-MOS





### V.1. INTRODUCCIÓN

La materia orgánica forma parte de los componentes del suelo, normalmente en baja proporción. Está formada por los restos vegetales y animales que por la acción de los microorganismos del suelo son transformados en compuestos complejos orgánicos y en nutrientes en forma mineral que son solubles para las plantas (Waksman, 1936) (Fig. V.1)



Fig. V.1. Representación de un corte transversal de un suelo con un contenido abundante de materia orgánica en la parte superior

La descomposición o mineralización de los restos orgánicos es un proceso oxidativo y llamamos **humus** a la materia orgánica oxidada resultante. Este concepto engloba un amplio espectro de constituyentes de naturaleza orgánica que proviene de la degradación biológica y bioquímica de restos animales y vegetales, así como productos del metabolismo de los microorganismos (Schnitzer, 1978). Por ello, la materia orgánica se acumula y es más abundante en los horizontes o capas superficiales del suelo, concretamente en los horizontes A (como el señalado en la Figura V.1) y B. El humus está formado por un complejo de macromoléculas en estado coloidal constituido por proteínas, azúcares, ácidos orgánicos, minerales, etc., en constante estado de degradación y síntesis. La materia orgánica transformada del suelo se divide en sustancias húmicas y sustancias no húmicas (Kononova, 1966; Khan, 1980; Tan, 2003; Fernandes, 2004).

Las **sustancias húmicas** comprenden el 60-80% de la materia orgánica del suelo. Están caracterizadas por tener estructuras aromáticas (compuestos fenólicos) y, debido a su complejidad, son materiales resistentes a ser degradados por los microorganismos. Dependiendo de su solubilidad encontramos tres tipos:

Los ácidos húmicos son solubles en soluciones alcalinas pero precipitan cuando se acidifica. Presentan una resistencia intermedia a la degradación microbiana.

Los ácidos fúlvicos son solubles en soluciones alcalinas y permanecen solubles cuando se acidifica. Son sustancias más susceptibles de ser degradadas por los microorganismos.

Las huminas son insolubles en soluciones alcalinas y ácidas. Son las sustancias que presentan más resistencia a la degradación microbiana.

Las **sustancias no húmicas** comprenden el 20-30% de la materia orgánica del suelo y están formadas por sustancias menos complejas y menos resistentes a la degradación frente a los microorganismos, como son los compuestos con bajos pesos moleculares de procedencia vegetal o animal: polisacáridos, polipéptidos, ácidos grasos, etc.

La materia orgánica proporciona una mejora en la agregación y en la estabilidad física del suelo, reduciendo la escorrentía y la erosión, y aumenta la capacidad de retención de humedad y la capacidad de intercambio catiónico del suelo, entre otras propiedades (Hedergren y Schwarzenbach, 1993).

La materia orgánica puede afectar a la dinámica y el comportamiento de los plaguicidas de diversas formas, tanto al transporte como a su degradación:

- La materia orgánica puede formar agregados con las partículas minerales del suelo, favoreciendo que los plaguicidas queden adsorbidos en los agregados, lo que puede aumentar su persistencia y reducir su movilidad (Zhou et al., 1994; Albarrán et al., 2003, 2004; Cabrera et al., 2008).

- La adsorción a agregados móviles puede dar lugar a un transporte facilitado de los plaguicidas a través del perfil del suelo hasta llegar a las aguas subterráneas, con el riesgo de contaminarlas (Rav-Acha y Rebhun, 1992; Aragón et al., 2001; Arias- Estévez et al., 2008; Hermosin et al., 2012).

- La presencia de materia orgánica en el suelo, puede provocar el aumento de las poblaciones de bacterias u hongos y aumentar los procesos de degradación del plaguicida aplicado (Guo et al., 1993; Wagner y Zablotowicz, 1997).

Los suelos de la región Mediterránea suelen ser suelos poco desarrollados y presentan un bajo porcentaje de materia orgánica. Por ello, la adición de residuos orgánicos es una práctica que puede resultar beneficiosa para aumentar la fertilidad de estos suelos (Tester, 1990), mejorar su estructura (Melero et al., 2007; Badalucco et al., 2010) e incluso incrementar su poder de retención de plaguicidas y otros compuestos agroquímicos, lo que puede evitar una rápida lixiviación de los mismos tras su aplicación durante actividades agrícolas (Celis et al., 1998a; Worrall et al., 2001; Fernandez-Bayo et al., 2009).

En los últimos años se han investigado distintos tipos de enmiendas orgánicas, como lodos de depuradoras (Celis et al., 1998a; Sánchez et al., 2003; Annabi et al., 2007; González et al., 2008; Suhadolc et al., 2010; Roig et al., 2012), residuos sólidos urbanos (Albaladejo et al., 1994; Cox et al., 2001; Madejón et al., 2003; Bastida et al., 2007; López-Piñeiro et al., 2011), carbón vegetal (Si et al., 2011), turba (Flores-Céspedes et al., 2002; Si et al., 2006) y residuos de almazaras (Cox et al., 1997b, 2001; Fernandes et al., 2006; De Martino et al., 2011), entre otros, para mejorar las propiedades físico-químicas de los suelos y facilitar una salida de residuos orgánicos generados por procesos industriales.

Entre los residuos orgánicos utilizados como enmiendas de suelos agrícolas mediterráneos destacan los residuos de almazaras o alperujos. El alperujo es el residuo sólido con elevado contenido en humedad formado por partes sólidas de la aceituna, restos grasos y aguas de vegetación, producido en el proceso de extracción de aceite en dos fases (Alburquerque et al., 2004). Dicho sistema se desarrolló a principios de los años 90, consiguiendo una reducción de hasta un 75% de los residuos generados y un menor consumo de agua, por lo que se denominó sistema ecológico. España adoptó el sistema de dos fases en sustitución del de tres fases para la extracción del aceite de oliva. En cambio, países como Italia y Grecia siguen utilizando el sistema de tres fases (Roig et al., 2006).

En las almazaras andaluzas se genera aproximadamente unos 4 millones de toneladas al año de alperujo procedentes de la industria del aceite de oliva, lo que representa un problema técnico, en cuanto a su eliminación y gestión, financiero y medioambiental (Rodríguez-Lucena et al., 2010). En el alperujo abundan las especies químicas solubles en agua y presenta una relación C/N muy elevada. La fracción orgánica es variada: proteínas (4-11%), lípidos (8-20%), ligninas (32-56%), hemicelulosa (27-42%), celulosa (14-25%) e hidratos de carbono solubles (1-16%) (Alburquerque et al., 2004) y contiene además nutrientes como el potasio que lo hacen atractivo como enmienda. No obstante, también contiene compuestos fitotóxicos, principalmente fenólicos (1-2%), que provocan la inhibición del crecimiento microbiano y de la germinación y el crecimiento vegetativo (Capasso et al., 1995; Ramos-Cormenzana et al., 1996; Linares et al., 2003).

Junto a propiedades interesantes como enmienda orgánica de suelos, también podemos encontrarnos con efectos adversos provocados por un vertido incontrolado de este tipo de residuos (Muncharaz, 1999; Aranda, 2006; Buendía, 2008):

- \* Coloración de las aguas, debido a los altos contenidos en taninos y por la baja degradabilidad de los compuestos carbonados que forman el residuo. Las partículas que componen el alperujo pueden impedir la normal transferencia del oxígeno en ambientes acuáticos, provocando un desequilibrio (Buendía, 2008).
- \* Deterioro del suelo, ya que aumenta la acidez del suelo e incrementa el contenido en sales (Buendía, 2008).
- \* Fitotoxicidad, debido a su contenido de compuestos fenólicos solubles en agua, a los que también se asocian efectos antimicrobianos.
- \* Aumento de la solubilidad de algunos metales pesados y facilitar el transporte y lixiviación de plaguicidas (Bejarano y Madrid, 1992).

El compostaje consiste en la descomposición biológica en condiciones aerobias y controladas de residuos orgánicos y resulta ser una buena alternativa para la transformación del alperujo como residuo y su reutilización como fertilizante. Presenta además la ventaja, frente a la aplicación directa de alperujo, de reducir el contenido en fenoles, aumentar el valor de pH y mejorar la relación C/N.



Fig. V.2. Imagen de pilas de compost de alperujo junto a un cultivo de olivar (Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente, 2012).

Sobre la base del conocido potencial de los materiales arcillosos de interaccionar con la materia orgánica del suelo, el objetivo del presente capítulo ha sido evaluar la capacidad de arcillas catiónicas y aniónicas de actuar como adsorbentes de la materia orgánica soluble (MOS) procedente de alperujo con el fin de reducir los posibles efectos adversos que dicha materia orgánica soluble puede provocar en suelos enmendados con alperujo. Los resultados podrían tener aplicación en el desarrollo de adsorbentes arcillosos para reducir la toxicidad de aguas de lavado de almazaras y también en cuanto a la posible coaplicación de arcillas a suelos agrícolas, junto al alperujo, para reducir las elevadas concentraciones de materia orgánica disuelta que pueden encontrarse en suelos enmendados con este residuo. Esto último podría reducir los efectos adversos asociados a la aplicación directa al suelo del alperujo como residuo sin compostar. Se han estudiado también los cambios en la capacidad adsorbente de los materiales arcillosos tras su interacción con la MOS procedente de alperujo para algunos compuestos orgánicos, con el fin de ilustrar el posible efecto beneficioso adicional de las arcillas relacionado con un aumento de la capacidad de retención de compuestos agroquímicos y otros compuestos orgánicos que pudieran estar presentes en los suelos.

**V.2. MATERIALES Y MÉTODOS****V.2.1. MATERIALES****V.2.1.1. Arcillas**

Para este trabajo se utilizaron dos arcillas tipo montmorillonita y dos arcillas tipo hidrotalcita, con el fin de comparar las propiedades que presentan las arcillas catiónicas con respecto a las arcillas aniónicas como adsorbentes de MOS.

a) Arcillas catiónicas. Una de las arcillas catiónicas fue la montmorillonita SWy-2 de Wyoming (EE.UU), rica en  $\text{Na}^+$ , suministrada por The Source Clays Repository of the Clay Minerals Society (Universidad de Purdue, Indiana), ya utilizada en el capítulo III de esta memoria.

También se utilizó otra arcilla rica en montmorillonita procedente de la localidad de Bailén, provincia de Jaén, con una composición más heterogénea que la SWy-2. Esta arcilla fue proporcionada por el Centro Tecnológico Innovarcilla y había sido tamizada con un tamiz de luz de malla de 250  $\mu\text{m}$  tras su extracción del depósito sin tratamiento de purificación adicional.

b) Arcillas aniónicas. La hidrotalcita carbonatada ( $\text{HTCO}_3$ ) utilizada para este capítulo corresponde a una hidrotalcita preparada en el laboratorio a un pH inferior al utilizado en la síntesis de la HT descrita en el capítulo anterior. Manteniendo la misma metodología de síntesis, la diferencia radicó en la disolución acuosa de NaOH utilizada para la preparación del hidróxido doble laminar, que contenía una concentración diez veces menor de NaOH, afectando al pH de la suspensión. Se comprobó que este tipo de HT tenía un menor grado de cristalinidad y pureza, lo que puede aumentar su capacidad de adsorción. Según Wang et al. (2012), la variación del pH de las disoluciones utilizadas en la síntesis de la hidrotalcita por coprecipitación influye en la cristalinidad de la muestra, por lo que las características del material dependen de la cantidad adicionada de NaOH que se utiliza en la síntesis.

La hidrotalcita calcinada ( $\text{HT}_{500}$ ) se obtuvo a partir de una porción de la hidrotalcita carbonatada, tras su calentamiento en una mufla (Orbesal MOD 12. PR/300 serie 8B) a una temperatura de 550 °C durante 3 horas.

**V.2.1.2. Alperujo: extracción de la MOS**

El alperujo utilizado en este trabajo fue un residuo fresco sin compostar suministrado por una almazara de Morón de la Frontera (Sevilla). El residuo no había sido sometido a un procedimiento de compostaje como tal, sino más bien

a un almacenamiento durante un período de tiempo variable en el que quedó expuesto a las condiciones ambientales (lluvia, sol, humedad, temperatura...).

Una vez en el laboratorio, se dejó secar a temperatura ambiente para eliminar el exceso de humedad que poseía. Posteriormente, se tamizó con un tamiz de 2 mm de luz de malla y se almacenó en botes de plástico hasta su utilización (Fig. V.3).



Fig. V.3. Imagen del alperujo tamizado a 2 mm utilizado en este estudio.

La disolución de **materia orgánica soluble (MOS)** procedente del alperujo utilizada en los experimentos se obtuvo agitando 2.5 g del alperujo tamizado a 2 mm y 50 ml de agua desionizada en tubos de centrifuga de 250 ml durante 24 h. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 10.000 r.p.m. y se separó el sobrenadante o disolución de MOS que se utilizó en los diferentes experimentos dentro de las 24 h siguientes a su extracción.

### V.2.1.3. Contaminantes orgánicos: herbicidas y dibenzofurano

Se seleccionaron, en este caso, dos tipos de contaminantes orgánicos: tres herbicidas, elegidos por sus distintas solubilidades y polaridad, y un hidrocarburo aromático policíclico (HPA o PAH), el dibenzofurano, con fines comparativos, como modelo de contaminante muy hidrófobo.

**a)** Herbicidas: En la Tabla V.1 se detallan algunas de las principales características físico-químicas de los plaguicidas utilizados en los experimentos. Se seleccionaron principalmente por presentar diferentes características de tipo físico-químico, principalmente por tener carga, grupos funcionales y solubilidades diversas, con el fin de intentar relacionar estas características estructurales con su posible afinidad por los complejos de montmorillonita e hidrotalcita con MOS.



Sus estructuras se muestran en la Fig. V.4. Durante años dichos herbicidas han sido utilizados en el cultivo del olivar y podemos encontrar bibliografía sobre su comportamiento en suelos enmendados (Cox et al., 2004; Albarrán et al., 2004; Cabrera et al., 2008; Cabrera et al., 2010; Barriuso et al., 2011; Cañero et al., 2012), lo que nos facilitó la comprensión de cómo interactúan con la materia orgánica soluble del alperujo.

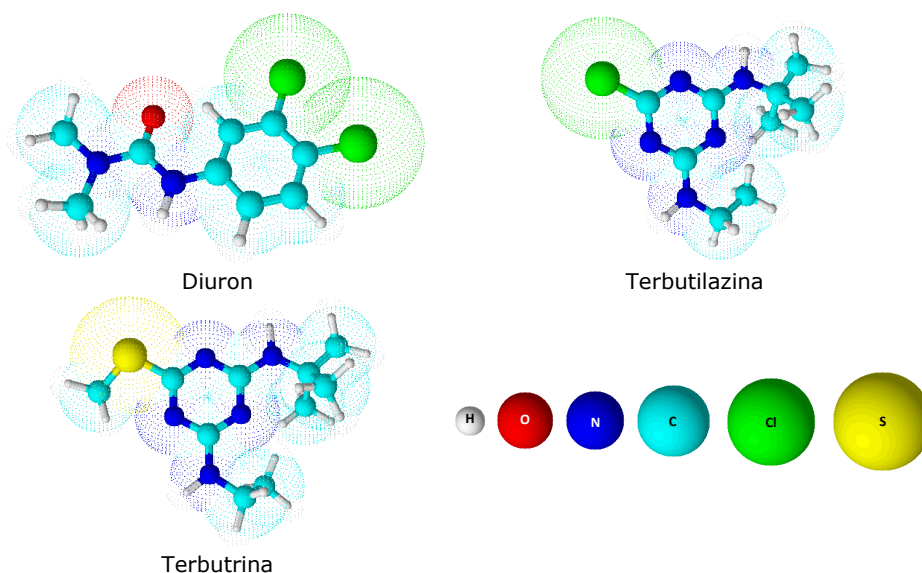
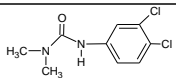
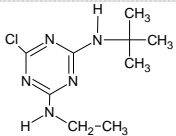
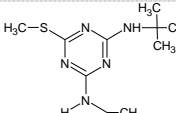


Fig. V.4. Estructura tridimensional de las moléculas de plaguicidas estudiados.

Tabla V.1. Algunas características de los plaguicidas estudiados<sup>a</sup>.

Pesticida	Estructura	Peso Molecular	Solubilidad en agua (mg/l)	pK <sub>a</sub>	Kow (P)	Característica de carga
Diuron		233.1	36	-	750	Neutro-polar
Terbutilazina		229.7	7	1.9	2500	Base débil
Terbutrina		241.4	22	4.3	4570	Base débil

<sup>a</sup> Datos tomados de Tomlin (2006)

**b)** Dibenzofurano: La Fig. V.5 representa la estructura tridimensional del dibenzofurano, que se utilizó como modelo de contaminante muy hidrofóbico en algunos experimentos. El dibenzofurano puede derivar del petróleo y de distintos procesos de combustión (carbón, desechos, combustibles etc.). En la Tabla V.2 se muestra algunas características de dicho compuesto.

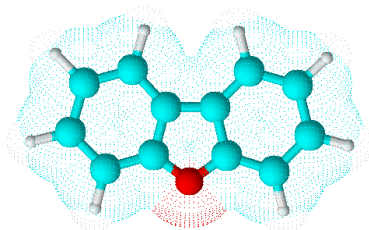
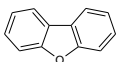


Fig. V.5. Estructura tridimensional del dibenzofurano

Se han encontrado elevadas concentraciones de dibenzofurano en aguas subterráneas próximas a sitios contaminados con creosota (Johansen et al., 1997). Este compuesto ha sido clasificado por la EPA's Great Waters Program como un contaminante a tener en cuenta debido a su persistencia en el medio ambiente, su potencial bioacumulación y por su toxicidad en humanos y en el medio ambiente (U.S. Environmental Protection Agency, 1994; Real, 2010).

Tabla V.2. Algunas características del dibenzofurano.

Compuesto	Estructura	Peso Molecular (g/mol)	Solubilidad en agua (mg/l)	pKa	Kow (P)	Característica de carga
Dibenzofurano		168.19	5	-	$> 10^4$	Neutro

#### V.2.1.4. Suelo

En este capítulo se ha utilizado el suelo 2, descrito en los capítulos anteriores. Es un suelo agrícola, franco arcillo-arenoso de pH alcalino. Se tomaron muestras de los 20 primeros cm de la capa superficial del suelo que se llevaron al laboratorio y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se tamizó con un tamiz de luz de malla de 2 mm y se almacenó en botes de plástico a 4 °C hasta su utilización. Las características de dicho suelo se encuentran recogidas en la Tabla III.3.

### **V.2.2. MÉTODOS**

#### **V.2.2.1. Caracterización de las arcillas y el alperujo**

Las **arcillas catiónicas y aniónicas** utilizadas en este capítulo se caracterizaron utilizando las técnicas de análisis elemental, superficie específica, difracción de rayos X y espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier. Los procedimientos se describen brevemente a continuación.

Análisis Elemental: En el caso de las arcillas aniónicas se realizó mediante espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (Espectrofotómetro ICP-OES Varian ICP 720-ES de configuración axial), en el cual se determinaron los contenidos en Mg y Al de las muestras previa disolución de las mismas (20 mg) con HCl al 37% (1 ml). Además, se determinó el contenido de C y N en las muestras sólidas, utilizándose un analizador Perkin-Elmer, modelo 1106. En el caso de las arcillas catiónicas, existían datos tabulados sobre su composición (SWy-2) o bien fueron suministrados por el Centro Tecnológico Innovarcilla (Bailén).

Superficie específica: Se midió por adsorción de N<sub>2</sub> a 77 K usando un equipo Carlo Erba Sorptomatic 1900 (Fisons Instruments, Milan). Las muestras se desgasificaron a 80 °C y se mantuvieron en condiciones de vacío durante 15 h previamente a la medida de la isoterma de adsorción de N<sub>2</sub>. La superficie específica de las muestras se calculó por aplicación del método B.E.T. (Brunauer et al., 1938) a la isoterma de adsorción de N<sub>2</sub> utilizando el intervalo de presiones relativas  $p/p_0 = 0.05-0.25$ . El área ocupada por la molécula de N<sub>2</sub> se consideró ser de 16.2 Å (IUPAC, 1985).

Difracción de Rayos X (XRD): Se realizaron directamente con las muestras sólidas en forma de polvo sobre el portamuestras. Se utilizó un difractómetro Siemens D-5000 con radiación CuK $\alpha$  y las condiciones de operación fueron un voltaje de 40 kV, una intensidad de 30 mA, velocidad de barrido 2 °/min y paso de 0.02° en unidades de 2 $\theta$ .

La muestra de **alperujo** se caracterizó mediante distintos análisis realizados en el Servicio de Análisis del IRNAS con la metodología habitual para residuos orgánicos. Se determinó el contenido en nitrógeno Kjeldahl, el pH y la conductividad eléctrica (en un extracto acuoso 1:5 p/v), el contenido de materia orgánica total por calcinación a 540 °C y los contenidos de algunos macro- y micro-nutrientes y metales pesados por ICP-OES. También se determinaron los contenidos de hemicelulosa, celulosa y lignina usando el método descrito por Goering y Van Soest (1970), así como el contenido en carbono orgánico soluble (COS) y el índice de humificación de la MOS (IH) en un extracto acuoso 1:20 (p/v) del alperujo.

### V.2.2.2. Estudio de las arcillas como adsorbentes de la MOS procedente de alperujo

Con el fin de evaluar comparativamente la capacidad de las diferentes arcillas de adsorber la materia orgánica soluble (MOS) procedente del alperujo, cantidades conocidas de cada arcilla (25, 100, 200 ó 400 mg) se trataron con 8 ml de la disolución de MOS procedente del alperujo extraída tal y como se describe en el apartado V.2.1.2. Las suspensiones se mantuvieron en agitación durante 24 h y se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm, obteniéndose dos tipos de muestras: una sólida (complejo arcilla-MOS) y el sobrenadante (MOS no adsorbida a las arcillas) (Fig. V.6). Las muestras sólidas (Fig. V.7) se dejaron secar en una estufa a 60 °C durante 24 h y, una vez secas, se molieron en un mortero de ágata para homogeneizarlas y se guardaron a temperatura ambiente en un vial de vidrio cerrado hasta su caracterización o utilización en los experimentos de adsorción de plaguicidas. Los sobrenadantes (Fig. V.8) se guardaron en una cámara fría a 4 °C para ser caracterizados inmediatamente mediante análisis de TOC, espectroscopia UV-VIS y espectroscopia de fluorescencia o utilizados en el ensayo de fitotoxicidad. Los procedimientos de caracterización de los sobrenadantes y los sólidos se describen brevemente a continuación.

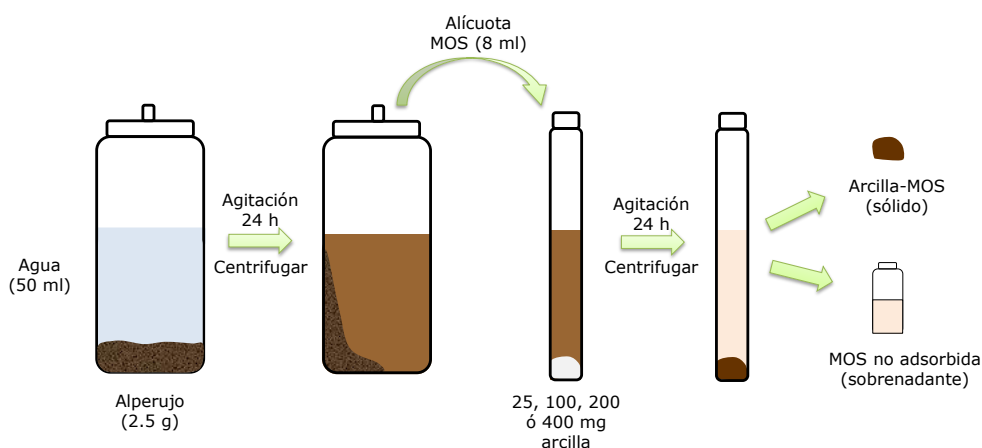


Fig. V.6. Representación gráfica de la extracción de la MOS, la posterior adsorción de la MOS a los adsorbentes y, finalmente, los sobrenadantes y complejos organoarcillosos obtenidos

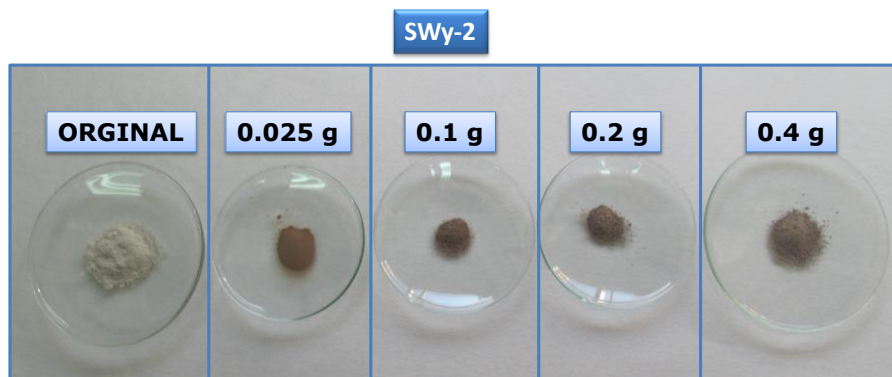


Fig. V.7. Imagen representativa de los sólidos obtenidos tras aplicar distintas cantidades de la arcilla SWy-2 a la disolución de MOS procedente del alperujo



Fig. V.8. Imagen representativa de los sobrenadantes obtenidos tras aplicar distintas cantidades de la arcilla SWy-2 a la disolución de MOS extraída del alperujo

#### V.2.2.2.1. Caracterización de los sobrenadantes

a) Carbono Orgánico Total: Se utilizó un analizador de Carbono Orgánico Total con módulo de nitrógeno Shimadzu TOC-V sch, que se encuentra en el Servicio de Análisis del IRNAS, para comparar la concentración de carbono orgánico disuelto de la disolución de MOS de alperujo original con la de los sobrenadantes obtenidos tras la interacción de ésta con las arcillas.

b) Espectroscopia Ultravioleta-Visible: Se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda EZ210 para comparar los espectros UV-VIS de la disolución de MOS de alperujo original y de los sobrenadantes obtenidos tras la interacción con las arcillas. Los espectros se obtuvieron en un rango de longitudes de onda comprendidas entre 200 y 600 nm. Tanto los sobrenadantes como la disolución inicial de MOS se diluyeron 1:25 antes de realizar las medidas de absorbancia en el espectrofotómetro.

c) Espectroscopia de Fluorescencia: Se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda EZ210 para comparar los espectros de fluorescencia de la disolución de MOS procedente del alperujo original y de los sobrenadantes obtenidos tras la interacción de ésta con las arcillas, utilizando una longitud de onda de excitación de 254 nm. Antes del análisis se realizó una dilución 1:100 de todas las muestras. Tras obtener los espectros de fluorescencia, se calculó el índice de humificación (IH) utilizando la expresión (Cox et al., 2000b):

$$IH = \frac{\frac{480}{\lambda=435} I_{\lambda}}{\frac{345}{\lambda=300} I_{\lambda}}$$

donde  $\lambda$  corresponde a la longitud de onda de la radiación emitida en nanómetros y  $I_{\lambda}$  corresponde a la intensidad de la emisión a una longitud de onda determinada.

d) Fitotoxicidad de los sobrenadantes. Para poner de manifiesto el efecto fitotóxico que presenta la materia orgánica soluble procedente de alperujo y su posible atenuación tras el tratamiento con arcillas se planteó el siguiente experimento:

Se prepararon macetas de plástico de 50 cm<sup>2</sup> de superficie, colocando en la parte inferior lana de vidrio para tapar los agujeros de desagüe y evitar pérdidas de suelo. Posteriormente se colocaron 30 g de arena de mar y se adicionaron 200 g de suelo 2 (Fig. V.9). Las macetas se saturaron con agua (control), con la disolución de MOS procedente de alperujo original o con el sobrenadante obtenido tras tratar la disolución de MOS con la arcilla HT500 a una relación sólido-disolución 100 mg:8 ml. Igualmente, se prepararon macetas tratadas con las mismas disoluciones de MOS pero diluidas al 5, 10 y 50% con agua destilada para reducir su toxicidad.

Tras someter las macetas de suelo a los distintos tratamientos, se sembraron 20 semillas de *Lepidum sativum* y se dispusieron al azar en un lugar apropiado para la germinación de las mismas. Transcurridas dos semanas, se cortó y pesó la masa herbácea aérea, para poder valorar el crecimiento de la planta bajo los diferentes tratamientos realizados.



Fig. V.9. Fotografía de las macetas utilizadas en los bioensayos con MOS proveniente de alperujo.

#### V.2.2.2.2. Caracterización de los complejos arcilla-MOS

Los complejos arcilla-MOS formados se caracterizaron utilizando las técnicas de análisis elemental de C y N total, difracción de rayos X, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier y resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ . Para los estudios de difracción de rayos X, espectroscopia FT-IR y NMR, se utilizaron los complejos obtenidos a partir de la interacción de 25 mg de arcilla con 8 ml de disolución de MOS, por su mayor contenido en MOS.

a) Análisis Elemental: se determinó el contenido de C y N en las muestras sólidas, utilizándose un analizador Perkin-Elmer, modelo 1106.

b) Difracción de Rayos X (XRD): Se realizaron sobre agregados orientados, secados al aire y calentados a 200 °C. Se utilizó un difractómetro Siemens D-5000 con radiación  $\text{CuK}\alpha$ , las condiciones de operación fueron un voltaje de 40 kV, una intensidad de 30 mA, velocidad de barrido 2 °/min y paso de 0.02° en unidades de 2 $\theta$ .

c) Espectroscopia Infrarroja: Para los estudios por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) se utilizó un espectrómetro Jasco FT / IR 6300 (Jasco Europa srl) colocando directamente las muestras sólidas en un portamuestras horizontal de reflectancia total atenuada (ATR). El barrido se realizó en el intervalo entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando un promedio de 32 registros para mejorar la relación señal:ruido. A los espectros obtenidos se les restó el de un blanco sobre la celda vacía para salvar las interferencias producidas por el  $\text{CO}_2$  y vapor de agua atmosféricos.

d)  $^{13}\text{C}$  NMR: Se utilizó un espectrómetro de NMR Bruker, modelo Avance III WB 600 MHz para muestras en estado sólido. Se utilizaron rotores de circonio de 4 mm de diámetro exterior. Se aplicó la técnica de ángulo de giro de polarización cruzada (CPMAS) con giro del rotor a 14 kHz. Se calibró con tetrametilsilano (0 ppm) para poder asignar posteriormente los picos de los espectros de NMR de  $^{13}\text{C}$ .

#### V.2.2.3. Evaluación de los complejos arcilla-MOS como adsorbentes de plaguicidas

Una vez sintetizados los complejos con la MOS adsorbida en las arcillas, se realizó un estudio para comprobar cómo se comportaban las distintas muestras frente a la adsorción de distintos plaguicidas.

Se pesaron 20 mg de adsorbente por duplicado y se les añadieron 8 ml de una disolución 1 mg/l del plaguicida en estudio. La suspensión se mantuvo en agitación durante 24 h, se centrifugó 10 min a 5000 rpm, filtrándose posteriormente el sobrenadante y analizándose la concentración de compuesto orgánico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para las medidas por HPLC, se utilizó un cromatógrafo de la casa comercial "Waters Millipore" compuesto por un controlador del sistema Waters 600E System Controller, un detector de radiación ultravioleta emitida por lámpara de deuterio Waters 998 Photodiode Array Detector y un inyector automático de muestras Waters 717 Autosampler.

En todos los casos, se utilizó para el análisis una columna Novapack C18 de 150 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno, con un flujo de fase móvil de 1 ml/min y un volumen de inyección de muestra de 25  $\mu\text{l}$  (Tabla V.3). Las curvas de calibración que se utilizaron para los análisis, se obtuvieron con patrones cuya concentración variaba entre 0.01 y 2 mg/l.

Tabla V.3. Condiciones analíticas para la determinación de los compuestos orgánicos por HPLC.

Plaguicidas	Fase Móvil <sup>a</sup>	$\lambda$ de detección (nm)	Tiempo de retención (min)	Tiempo de análisis (min)
Diuron	H <sub>2</sub> O:ACN (60 : 40)	250	4.5	10
Terbutilazina	H <sub>2</sub> O:ACN (60 : 40)	220	7.9	10
Terbutrina	H <sub>2</sub> O:MeOH (25 : 75)	222	4.0	8
Dibenzofurano <sup>b</sup>	H <sub>2</sub> O:ACN (30 : 70)	280	3.5	7

<sup>a</sup> ACN: acetonitrilo; MeOH: metanol; <sup>b</sup> El dibenzofurano se utilizó a título comparativo como ejemplo de compuesto orgánico muy hidrofóbico.



La cantidad de plaguicida adsorbido ( $C_s$ ) se obtuvo a partir de la diferencia entre la concentración de la disolución inicial del plaguicida ( $C_{ini}$ ) y la de equilibrio ( $C_e$ )

$$C_s = [(C_{ini} - C_e) / M] \times V$$

donde:

$C_s$ : es la cantidad adsorbida de plaguicida (mg/kg)

$C_{ini}$ : es la concentración inicial del plaguicida (mg/l)

$C_e$ : concentración de plaguicida en la disolución de equilibrio (mg/l)

$M$ : masa del adsorbente (kg)

$V$ : volumen de la disolución (l)

Los porcentajes de plaguicida adsorbido, % Ads, a la concentración inicial utilizada se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Ads} = [(C_{ini} - C_e) / C_{ini}] \times 100,$$

mientras que los coeficientes de distribución  $K_d$  (l/kg) se calcularon como:

$$K_d = C_s / C_e$$

#### **V.2.2.4. Evaluación de los complejos arcilla-MOS con respecto a las arcillas originales como adsorbentes de plaguicidas en presencia de suelo**

Este estudio se realizó para evaluar la adsorción de plaguicidas por los complejos arcilla-MOS que pudieran resultar de la adición al suelo de las arcillas en presencia de MOS procedente de alperujo, con el fin de reducir elevadas concentraciones de ésta tras la aplicación al suelo del residuo.

Se pesaron, por triplicado, 0.5 g del suelo 2 en tubos pyrex y a continuación se enmendaron con 0.05 g de las arcillas originales utilizadas en este estudio (SWy-2, Bailén,  $\text{HTCO}_3$  y  $\text{HT}_{500}$ ), para posteriormente agregar 8 ml de una disolución de 1 mg/l del plaguicida en estudio preparada bien en agua bien en la disolución original de MOS extraída de alperujo. También se pesaron muestras de suelo sin enmendar que se trataron con la disolución de plaguicida en agua y en MOS con fines comparativos. Las suspensiones se agitaron durante 24 h a una temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, y se tomaron alícuotas de 4 ml del sobrenadante, que se filtraron y posteriormente se analizaron por HPLC.

La cantidad de plaguicida adsorbido ( $C_s$ ), los porcentajes de adsorción (% Ads) y el coeficiente de distribución ( $K_d$ ) se calcularon siguiendo la metodología que se explica en el apartado anterior.

### V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### V.3.1. Caracterización de los adsorbentes y el alperujo

##### V.3.1.1. Caracterización de las arcillas

##### a) Análisis químico

Los datos tabulados sobre la composición química de la arcilla **SWy-2**, ampliamente utilizada en la bibliografía como arcilla de referencia (The Clay Minerals Society), se muestran en la Tabla V.4.

Tabla V.4. Datos tabulados de la composición química de la arcilla SWy-2.

	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	TiO <sub>2</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CaO	MgO	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	MnO
<b>Porcentaje (%)</b>	62.9	19.6	0.09	3.35	1.68	3.05	0.53	1.5	0.006

Otros datos de interés sobre esta arcilla son que posee una capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 76.4 cmol/kg y una superficie específica medida por adsorción de N<sub>2</sub> de 32 m<sup>2</sup>/g. Se trata de una arcilla rica en montmorillonita con sustituciones isomórficas de Al<sup>3+</sup> por Mg<sup>2+</sup> en la capa octaédrica y con Na<sup>+</sup> (y en menor medida Ca<sup>2+</sup>) como principal catión de cambio (The Clay Minerals Society).

En la Tabla V.5 se muestra la composición química de la arcilla de **Bailén** y en la Tabla V.6 su composición mineralógica. La arcilla de Bailén presenta una composición más heterogénea que la arcilla de referencia SWy-2, consistente en cuarzo, carbonatos y filosilicatos prácticamente a partes iguales (Tabla V.6). Los filosilicatos están dominados por esmectitas, que representan aproximadamente el 30% del total de la muestra de arcilla.

Tabla V.5. Composición química de la arcilla de Bailén.

	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	TiO <sub>2</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CaO	MgO	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	MnO
<b>Porcentaje (%)</b>	47.5	8.8	0.5	3.3	16.6	1.7	1.9	0.4	0.04

Tabla V.6. Composición mineralógica de la arcilla de Bailén.

Minerales	Cuarzo	Carbonatos	Filosilicatos
<b>Porcentaje (%)</b>	33	32	35

En la Tabla V.7 se presentan los porcentajes de los elementos químicos analizados para las arcillas aniónicas sintetizadas para este estudio: **HTCO<sub>3</sub>** y **HT<sub>500</sub>**.

La hidrotalcita de partida (HTCO<sub>3</sub>), como se explica en el apartado V.2.1.1, se sintetizó en condiciones deficitarias de NaOH para promover una menor cristalinidad de la muestra. Como puede observarse en la Tabla V.7, el principal efecto de estas condiciones de síntesis fue un descenso de la relación Mg/Al, tanto para la muestra HTCO<sub>3</sub> como para su producto de calcinación (HT<sub>500</sub>), debido a que el Al tiende a precipitar antes que el Mg. Esta baja relación Mg:Al con respecto a la relación Mg:Al de la disolución empleada para la síntesis (3:1) indica que una disminución del pH durante la síntesis da lugar a una menor cantidad de hidrotalcita y con una relación Mg:Al más pequeña, tal y como describen Wang et al. (2012). Se ha apuntado que las estructuras tipo hidrotalcita pueden existir en un rango muy amplio de relaciones Mg:Al que oscilan entre 9 y 1, aunque en los límites de este rango es frecuente observar la presencia de impurezas en el material obtenido (Cavani et al., 1991).

Tabla V.7. Porcentaje de los elementos analizados de la hidrotalcita inicial (HTCO<sub>3</sub>) y de su producto de calcinación (HT<sub>500</sub>).

Muestra	Masa (%)				Relación molar
	Mg	Al	C	N	Mg/Al
<b>HTCO<sub>3</sub></b>	16.5	15.3	2.3	<0.05	1.2
<b>HT<sub>500</sub></b>	27.2	22.9	1.2	<0.05	1.3

## b) Difracción de rayos X

La Fig. V.10 muestra los difractogramas de polvo de las cuatro arcillas utilizadas en este capítulo.

Los picos que aparecen en el difractograma de la muestra SWy-2 se corresponden con la presencia mayoritaria de montmorillonita, acompañada de trazas de cuarzo, mientras que en el difractograma de la arcilla de Bailén se identificaron difracciones correspondientes a cuarzo, los carbonatos calcita y dolomita y los filosilicatos montmorillonita e illita, reflejando así la composición más heterogénea de esta muestra.

Los difractogramas de las muestras HTCO<sub>3</sub> y HT<sub>500</sub> se corresponden con el de una arcilla tipo hidrotalcita de baja cristalinidad, acompañada de algunas impurezas de Al(OH)<sub>3</sub>, y con el de su producto de calcinación. Es de destacar que los picos de la muestra HTCO<sub>3</sub> presentan una mayor anchura que los de la muestra de hidrotalcita preparada en el capítulo anterior (Fig. IV.14), así como

una menor intensidad, corroborando que las condiciones limitantes de  $\text{OH}^-$  en las que se llevó a cabo la síntesis reduce la cristalinidad del producto obtenido (Wang et al., 2012).

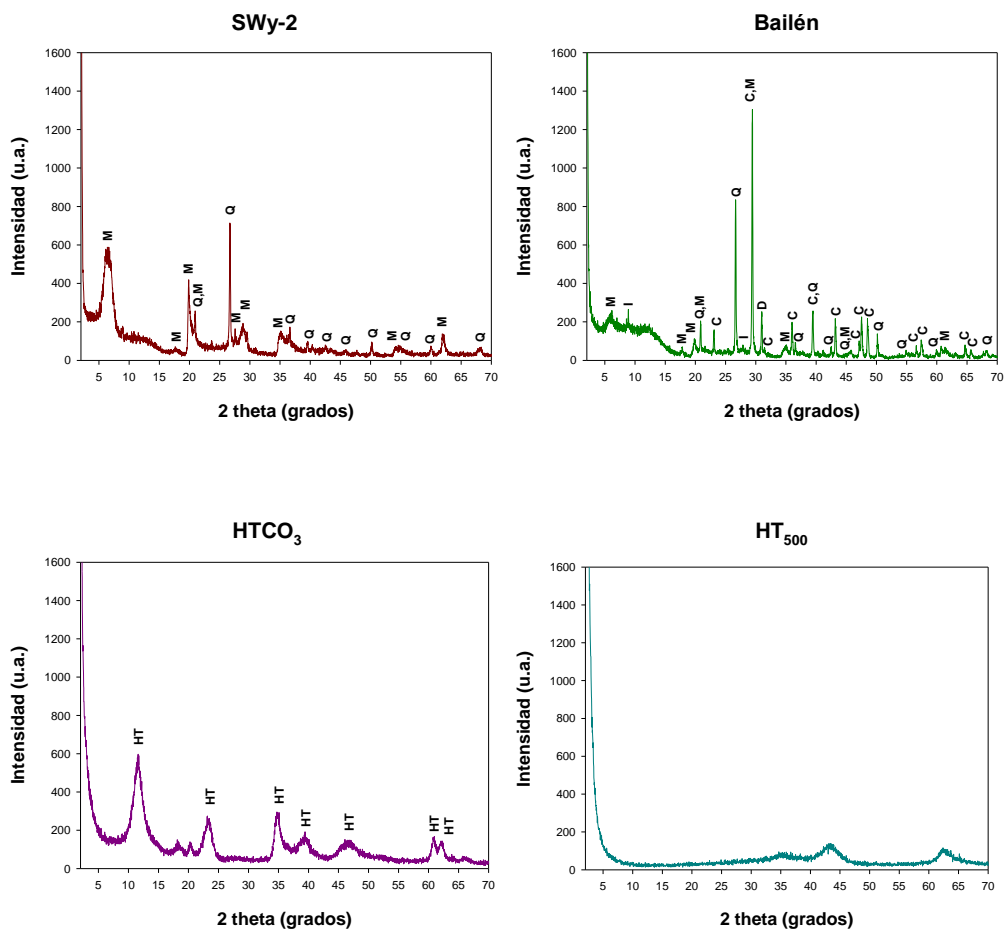


Fig. V.10. Difractogramas de polvo de las arcillas originales SWy-2, Bailén,  $\text{HTCO}_3$  y  $\text{HT}_{500}$ . M: Montmorillonita, Q: Cuarzo, C: Calcita, D: Dolomita, I: Illita, HT: Hidrotalcita.

### c) Superficie específica

La Fig. V.11 muestra las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno a 77 K para las arcillas, junto con los valores de superficie específica obtenidos tras aplicar el método BET a los datos de adsorción. Los valores de superficie específica oscilaron entre los  $25 \text{ m}^2/\text{g}$  para la muestra SWy-2 y los  $262 \text{ m}^2/\text{g}$  para la  $\text{HT}_{500}$  (Fig. V.11).

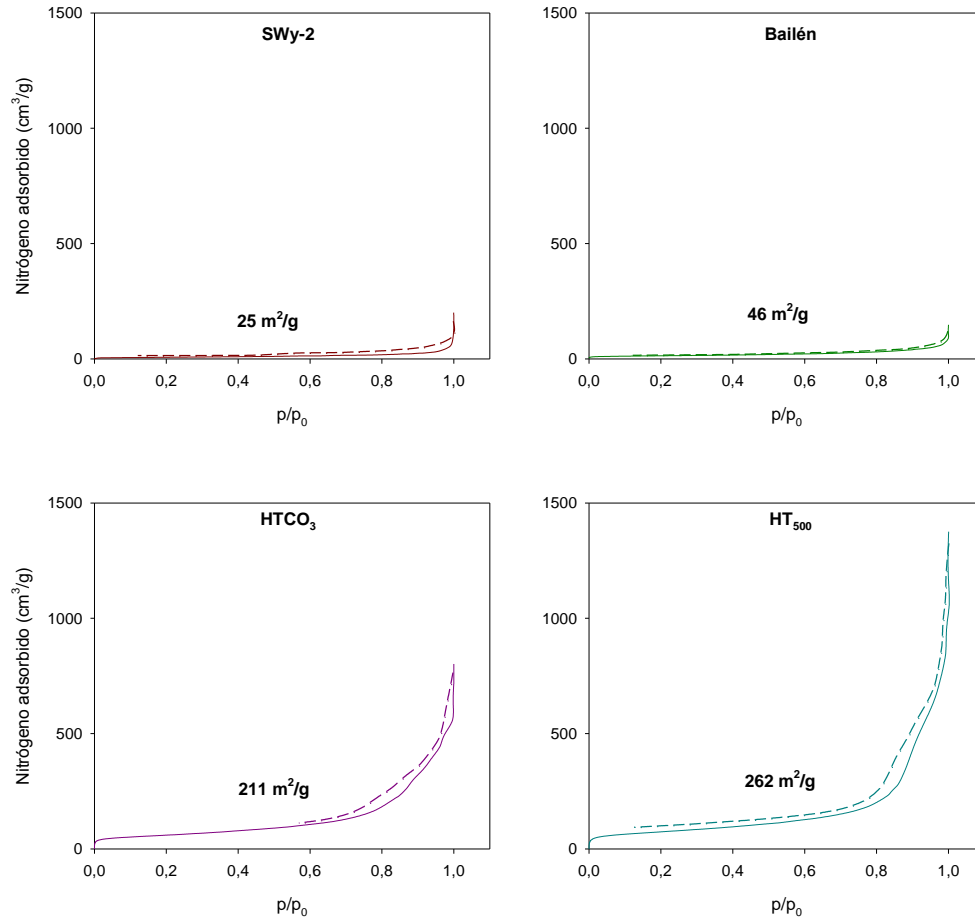


Fig. V.11. Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno para las muestras de arcilla originales: SWy-2, Bailén, HTCO<sub>3</sub>, HT<sub>500</sub>.

Las arcillas catiónicas (SWy-2 y Bailén) presentaron superficies BET más bajas que las arcillas aniónicas (HT y HT<sub>500</sub>). Teniendo en cuenta que el nitrógeno sólo accede a la superficie externa de las arcillas y que no suele tener acceso a los espacios interlaminares (Aylmore et al., 1970), las arcillas aniónicas probablemente presentaron un menor tamaño de partícula que las catiónicas, lo que se tradujo en una mayor superficie externa.

En el caso de las arcillas catiónicas, la mayor superficie BET de la arcilla de Bailén con respecto a la arcilla de referencia SWy-2 podría estar relacionada con su mayor heterogeneidad. Para las arcillas aniónicas, se observa una diferencia significativa entre la superficie BET de la muestra HTCO<sub>3</sub> y la de la misma muestra calcinada a 500 °C (HT<sub>500</sub>). Se sabe que, tras ser calcinada, la muestra HTCO<sub>3</sub> pierde su estructura laminar transformándose en un óxido mixto

amorfo con una elevada superficie específica (Cornejo et al., 2000; Wang et al., 2012). La superficie específica de la muestra  $\text{HTCO}_3$  resultó ser superior a la medida por otros autores para muestras similares más cristalinas (Cornejo et al., 2000; Bruna, 2010), lo que ilustra la relación inversa cristalinidad-superficie específica y hace prever una mayor capacidad adsorbente de la muestra preparada en el presente trabajo.

### V.3.1.2. Caracterización del alperujo

El alperujo utilizado en este trabajo se seleccionó sobre la base de ensayos preliminares que indicaron que, a diferencia de otros residuos de almazara considerados, combinaba un conjunto de características que hacían que su materia orgánica soluble pudiera ser particularmente propensa a ejercer efectos adversos una vez añadida al suelo. Principalmente, se trataba de un alperujo no compostado, con un bajo índice de humificación, bajo pH y un elevado contenido en carbono orgánico soluble. Éstas y algunas otras características se encuentran resumidas en la Tabla V.8. También se determinó el contenido de algunos macronutrientes y micronutrientes y de algunos metales pesados del residuo, cuyos valores se recogen en la Tabla V.9.

Tabla V.8. Algunas propiedades físico-químicas del alperujo utilizado<sup>a</sup>

pH	MOT (%)	N Kjeldahl (%)	CE ( $\text{mS cm}^{-1}$ )	H (%)	C (%)	L (%)	COS ( $\text{g l}^{-1}$ )	IH
4.8	91	1.1	9.1	15.9	23.8	23.5	4.5	0.3

<sup>a</sup> MOT: materia orgánica total obtenida por calcinación a 540 °C; CE: conductividad eléctrica; H: hemicelulosa; C: celulosa; L: lignina; COS: carbono orgánico soluble y IH: índice de humificación (medidos en un extracto de 2.5 g de alperujo : 50 ml de agua).

Como se muestra en la Tabla V.8, el alperujo posee un bajo valor de pH (4.8) y un elevado valor de COS, que son características típicas de residuos de almazaras frescos, no sometidos a procesos de maduración o compostaje. Los valores de contenido de materia orgánica y nitrógeno están dentro del rango de valores publicados por Alburquerque et al. (2004) para once alperujos procedentes de distintas almazaras de España.

La cantidad de hemicelulosa, celulosa y lignina (Tabla V.8) es indicativa del proceso de humificación, debido a que las concentraciones de lignina y celulosa suelen disminuir durante el compostaje (Komilis y Ham, 2003; Alburquerque et al., 2009). En este estudio, el alperujo presentó unos valores relativamente elevados que apoyan que el residuo posee un bajo grado de madurez. Además, la elevada acidez del residuo (pH 4.8) puede atribuirse a la

presencia de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, lípidos y fenoles, los cuales durante el compostaje reducen su presencia (Alburquerque et al., 2006).

Respecto a la conductividad eléctrica (CE) (Tabla V.8), el alperujo muestra una CE relativamente elevada, concordando con los valores obtenidos por Roig et al. (2006). Una elevada CE puede deberse al tipo de agua utilizada en el lavado de la aceituna en la almazara, la cual puede variar en fuerza iónica y dureza.

Los valores de micronutrientes y macronutrientes del alperujo fueron similares a los obtenidos en otros estudios (Alburquerque et al., 2004; Roig et al., 2006), aunque el contenido en Cu fue mayor a los valores detectados para otros alperujos (Roig et al., 2006). Este resultado podría explicarse por el uso de sulfato de cobre en algunos cultivos de olivar para evitar infecciones fúngicas. Otros elementos como el Pb, Ni y Fe mostraron valores ligeramente altos en comparación con los que generalmente se encuentra en la bibliografía y su presencia se relaciona con la maquinaria utilizada en las almazaras durante el proceso de fabricación del aceite de oliva (Roig et al., 2006; Alburquerque et al., 2009).

Tabla V.9. Porcentajes de algunos macronutrientes y micronutrientes y metales pesados contenidos en el alperujo utilizado.

<b>Al (%)</b>	<b>Co (%)</b>	<b>Cu (%)</b>	<b>Fe (%)</b>	<b>Mg (%)</b>	<b>Mn (%)</b>	<b>Ni (%)</b>	<b>Pb (%)</b>
0.217	<0.001	0.002	0.057	0.22	0.021	<0.001	0.003

<b>As (%)</b>	<b>Ca (%)</b>	<b>Cd (%)</b>	<b>K (%)</b>	<b>Na (%)</b>	<b>P (%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>Zn (%)</b>
<0.001	1.06	<0.001	2.02	0.771	0.370	0.374	0.002

En resumen, a partir de los resultados obtenidos tras la caracterización del alperujo puede concluirse que éste presenta una serie de características como son el carácter ácido, bajo índice de humificación y bajo grado de madurez, que sugieren la presencia de compuestos fitotóxicos de bajo peso molecular, cuya disminución resultaría particularmente deseable para la reutilización del residuo en actividades agrícolas y/o industriales.



**V.3.2. Evaluación de las arcillas como adsorbentes de la MOS del alperujo.**

La capacidad adsorbente de las diferentes arcillas para la materia orgánica soluble (MOS) procedente del alperujo se evaluó haciendo interaccionar cantidades conocidas de cada arcilla (25, 100, 200 ó 400 mg) con 8 ml de una disolución de MOS extraída del alperujo ( $\text{pH} = 4.8$ ) según se detalla en el apartado V.2.1.2. Tras agitar (24 h) y centrifugar las suspensiones, se separaron las dos fases resultantes: una sólida (complejo arcilla-MOS) y el sobrenadante (MOS no adsorbida a las arcillas), cuyos resultados de caracterización se discuten a continuación.

**V.3.2.1. Caracterización de los sobrenadantes****a) Color**

La decoloración de la disolución de MOS tras su interacción con las arcillas constituyó una primera indicación cualitativa de la capacidad de las arcillas de adsorber la MOS del alperujo y, en particular, de adsorber los compuestos que le proporcionan el color característico a la misma: fenoles, taninos, etc. (Cabrera, 1995; Belaid et al., 2006; Kotta et al., 2007). Como puede observarse en la Fig. V.12, y más claramente en las muestras seleccionadas de la Fig. V.13, la decoloración de la disolución de MOS por las arcillas siguió el orden: Bailén < SWy-2 <  $\text{HTCO}_3$  <  $\text{HT}_{500}$ , es decir, las arcillas aniónicas ( $\text{HTCO}_3$  y  $\text{HT}_{500}$ ) fueron más efectivas que las catiónicas (SWy-2 y Bailén) a la hora de decolorar la disolución de MOS. Además, para las arcillas aniónicas se observó un aumento de la decoloración al aumentar la cantidad de arcilla añadida, mientras que este efecto no se observó para las arcillas catiónicas. Este último comportamiento podría estar relacionado con el hecho de que todas las arcillas provocaron un aumento del pH de la disolución de MOS, que fue más pronunciado al aumentar la cantidad de arcilla añadida (Tabla V.10). Este aumento de pH podría haber favorecido la presencia de cargas negativas en la MOS, lo que aumentaría su afinidad por las arcillas aniónicas, reduciéndola por las catiónicas.

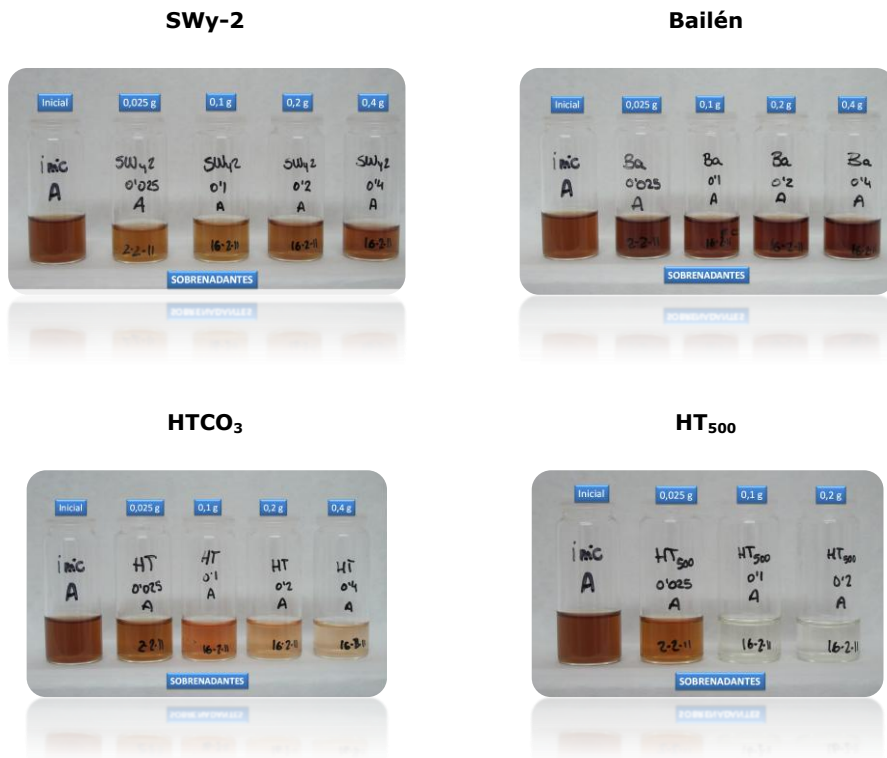


Fig. V.12. Imágenes de los sobrenadantes obtenidos tras tratar 8 ml de la disolución de MOS procedente del alperujo con distintas cantidades de arcilla (0.025, 0.1, 0.2 y 0.4 g).



Fig. V.13. Imagen representativa de la diferencia de color de los sobrenadantes obtenidos tras tratar 8 ml de la disolución de MOS procedente del alperujo con 0.2 g de las distintas arcillas.

### b) Carbono Orgánico Total

El análisis cualitativo anterior se completó analizando la concentración de carbono orgánico total (COT) en los sobrenadantes y comparándola con la de la disolución inicial de MOS extraída del alperujo. De esta manera, se obtuvo una estimación cuantitativa del carbono orgánico adsorbido por las arcillas, que se expresó como porcentaje del COT presente en la disolución de MOS inicial (~ 4500 mg/l) y como miligramos de C orgánico adsorbido por gramo de arcilla añadida. En la Tabla V.10 se muestran los resultados obtenidos.

En general, la cantidad de carbono orgánico adsorbido aumentó con la cantidad de arcilla añadida, aunque en algunos casos (arcillas catiónicas) el aumento fue pequeño, probablemente porque un aumento en la cantidad de arcilla pudo haber estado acompañado por cambios en otros parámetros, como el pH, que compensaran el esperado aumento en la adsorción al aumentar la cantidad de adsorbente.

Tabla V.10. Cantidad de carbono orgánico adsorbido tras añadir diferentes cantidades de arcillas a la disolución de MOS procedente de alperujo (expresada como porcentaje de la cantidad de carbono orgánico inicial en la disolución de MOS y como mg de C por g de arcilla añadida). El pH inicial de la disolución de MOS fue de 4.8.

Arcilla	Cantidad de arcilla añadida (mg)	pH del sobrenadante	Carbono orgánico adsorbido (%)	Carbono orgánico adsorbido (mg/g)
SWy-2	25	5.1	12.7 ± 0.3	186
SWy-2	100	5.5	38.0 ± 1.9	139
SWy-2	200	6.1	37.2 ± 1.6	68
SWy-2	400	6.7	39.1 ± 3.6	36
Bailén	25	6.1	4.2 ± 0.9	61
Bailén	100	6.7	19.9 ± 13.4	73
Bailén	200	6.9	34.2 ± 0.3	63
Bailén	400	7.0	35.8 ± 0.3	33
HTCO <sub>3</sub>	25	6.9	8.5 ± 0.3	124
HTCO <sub>3</sub>	100	7.8	23.3 ± 1.2	85
HTCO <sub>3</sub>	200	8.1	32.5 ± 0.3	59
HTCO <sub>3</sub>	400	8.4	38.3 ± 0.1	35
HT <sub>500</sub>	25	9.1	13.9 ± 0.3	203
HT <sub>500</sub>	100	11.2	63.0 ± 0.1	231
HT <sub>500</sub>	200	11.8	75.8 ± 0.3	139
HT <sub>500</sub>	400	-	81.8 ± 0.8	75

Por otra parte, puede comprobarse que la reducción de la concentración de COT en disolución no estuvo totalmente relacionada con la decoloración de los sobrenadantes mencionada en el apartado anterior. Por ejemplo, aunque la

arcilla aniónica  $\text{HTCO}_3$  provocó una decoloración más acentuada que las arcillas catiónicas SWy-2 y Bailén (Fig. V.13), la cantidad de carbono orgánico total adsorbida por estas tres muestras no fue muy diferente (Tabla V.10). La arcilla aniónica calcinada,  $\text{HT}_{500}$ , sí destacó por su elevada capacidad de reducir la concentración de COT de la disolución de MOS (hasta en más de un 80%, Tabla V.10), en consonancia con su elevada capacidad de decoloración de la disolución comentada en el apartado anterior (Fig. V.13). Esta alta capacidad adsorbente que presenta la muestra  $\text{HT}_{500}$  puede atribuirse a su elevada superficie específica y al efecto memoria por el que, en contacto con el agua, puede rehidratarse incorporando compuestos aniónicos presentes en el medio en su estructura (Cavani et al., 1991).

### c) Espectroscopia Ultravioleta-Visible

En la espectroscopia de absorción ultravioleta-visible, aplicada a la caracterización de MOS, la muestra absorbe la radiación electromagnética UV-VIS emitida por la fuente y la cantidad absorbida puede relacionarse con la concentración y naturaleza de la MOS presente en la muestra analizada (Hassouna et al., 2010; Grayson y Holden, 2012).

En la Fig. V.14 se muestran los espectros UV-VIS de la disolución de MOS procedente de alperujo antes y después de su interacción con las diferentes arcillas para la relación sólido:disolución de 200 mg:8 ml. La absorbancia se midió desde los 200 hasta los 600 nm de longitud de onda. En el caso de los sobrenadantes de las arcillas catiónicas (SWy-2 y Bailén), la forma de los espectros es parecida a la del espectro de la disolución de MOS inicial, con un máximo de absorbancia próximo a los 210 nm y otro cercano a los 280 nm, aunque de menor intensidad. Para las arcillas aniónicas ( $\text{HTCO}_3$  y  $\text{HT}_{500}$ ), la disminución en absorbancia es tan pronunciada que los dos máximos se vuelven casi imperceptibles. Los espectros muestran una reducción generalizada de la absorbancia en el rango UV-VIS en el orden: Bailén < SWy-2 <  $\text{HTCO}_3$  <  $\text{HT}_{500}$ , que coincide con la decoloración de la disolución provocada por las diferentes arcillas (Fig. V.13). Es de destacar que en el límite inferior de las longitudes de onda analizadas pueden absorber especies diferentes a la MOS como nitratos, sulfatos y otras sales inorgánicas (Tipping et al., 1988; Minero et al., 2007).

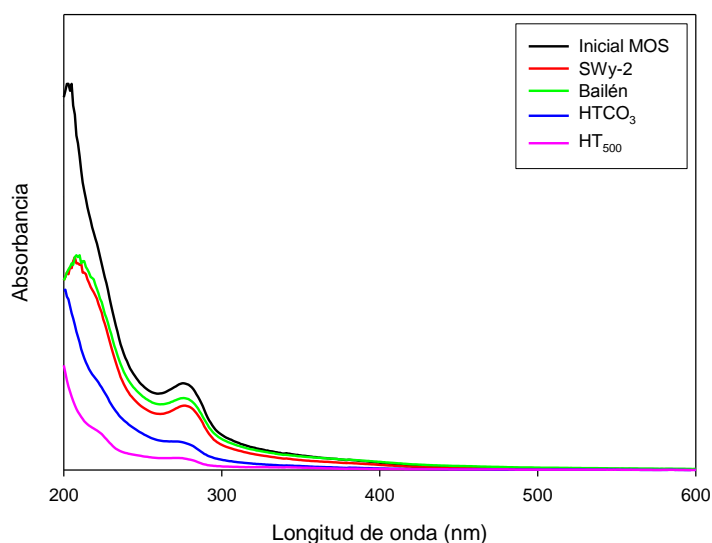


Fig. V.14. Espectros de absorción UV-VIS de la disolución de MOS procedente de alperujo antes y después de su tratamiento con las arcillas a una relación sólido disolución de 200 mg:8 ml.

A partir de los espectros obtenidos, se calculó la disminución en absorbancia a tres longitudes de onda seleccionadas: 254, 280 y 400 nm (Fig. V.15). Estas longitudes de onda fueron elegidas porque, según la bibliografía, pueden relacionarse con distintas propiedades relacionadas con la materia orgánica soluble. La absorción a 254 nm, utilizada durante décadas como indicador de la concentración de carbono orgánico disuelto en muestras ambientales (Grayson y Holder, 2012), se ha relacionado con la aromaticidad de la materia orgánica (Chen et al., 2002; Hassouna et al., 2010; Piirsoo et al., 2012), la absorción a 280 nm con la presencia de compuestos tipo fúlvicos (derivados de la anilina, compuestos fenólicos, etc.) (Chin et al., 1994; Korshin et al., 1999; Kalbitz et al., 2003; Jaffrain et al., 2007; Giovanela et al., 2010; Piirsoo et al., 2012) y la absorción a 400 nm con la presencia de sustancias coloreadas debido a la existencia de dobles enlaces conjugados, grupos funcionales tipo quinonas y ceto-enólicas, etc. (Giovanela et al., 2010; Wallage y Holden, 2010). Específicamente, para caracterizar la MOS de residuos de almazaras, los valores de absorbancia a  $\sim 280$  y  $\sim 400$  nm se han utilizado como indicadores del contenido en polifenoles y de la coloración, respectivamente (Belaïd et al., 2006; Hanafi et al., 2010).

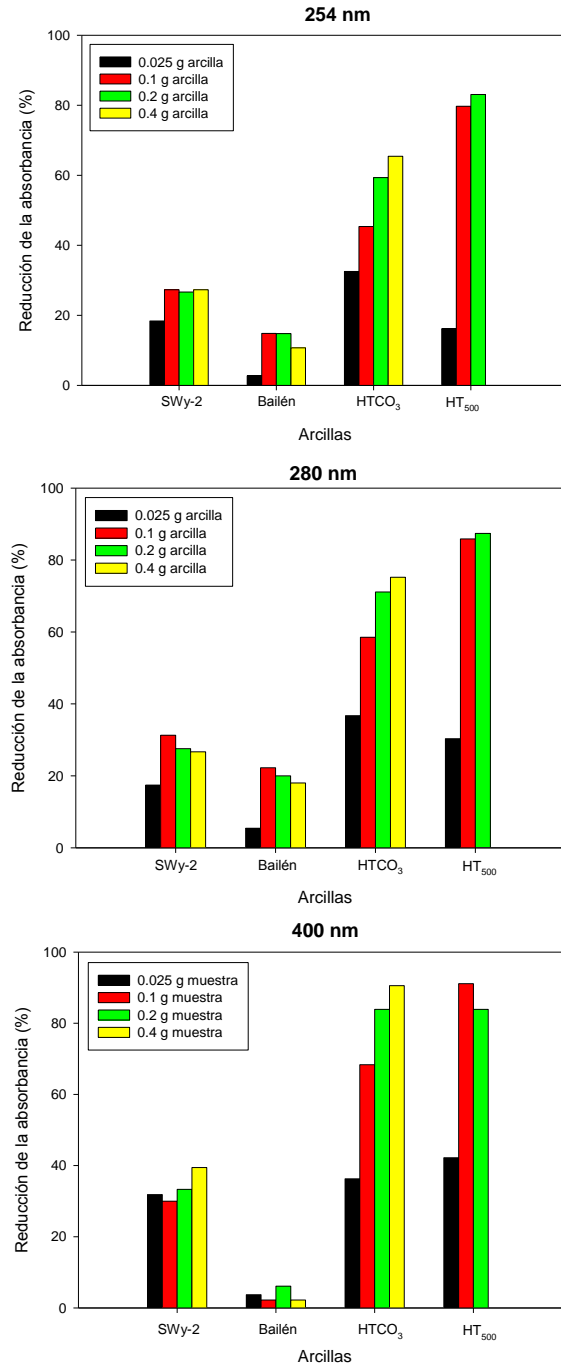


Fig. V.15. Reducción de la absorbancia a tres longitudes de onda diferentes (254, 280 y 400 nm) de la disolución de MOS extraída de alperujo tras su tratamiento con diferentes cantidades de arcilla.

En general, a las tres longitudes de onda analizadas la disminución de la absorbancia siguió el orden: Bailén < SWy-2 <  $\text{HTCO}_3$  <  $\text{HT}_{500}$  y los datos sugieren la elevada capacidad de las arcillas aniónicas ( $\text{HTCO}_3$  y  $\text{HT}_{500}$ ) de eliminar tanto los polifenoles (285 nm) como la coloración (400 nm) de la disolución de MOS (Hanafi et al., 2010). La escasa capacidad de la arcilla de Bailén de reducir la absorbancia a 400 nm concuerda con su efecto casi imperceptible en la coloración de la disolución que se muestra en las Figs. V.12 y V.13.

#### **d) Espectroscopia de Fluorescencia**

El estudio de espectroscopia de fluorescencia se realizó para profundizar en la tipología de la MOS antes y después de su interacción con una de las arcillas catiónicas (SWy-2) y una de las arcillas aniónicas ( $\text{HT}_{500}$ ). La Fig. V.16 muestra los espectros de fluorescencia de la disolución de MOS antes y después de la interacción con dichas arcillas, obtenidos utilizando una longitud de onda de excitación de 254 nm. Para comprobar que las muestras SWy-2 y  $\text{HT}_{500}$  no liberaban a la disolución especies que pudieran interferir en los espectros de fluorescencia, se registraron los espectros de disoluciones acuosas libres de MOS tratadas con las arcillas, que también se muestran en la Fig. V.16 con fines comparativos.

El espectro de fluorescencia de la disolución inicial de MOS procedente del alperujo presenta un máximo de emisión a longitudes de onda en la región de los 300-320 nm. En esta región fluorescen las moléculas de menor peso molecular, polares, menos complejas y material no humificado (Senesi et al., 1991; Spark y Swift, 1994). La proporción de moléculas más pequeñas y menos complejas parece ser, por tanto, superior a la de moléculas más complejas y/o humificadas, las cuales suelen fluorescer en la región de longitudes de onda superiores a los 400 nm (Visser, 1983; Senesi et al., 1991; Zsolnay et al., 1999; Cox et al., 2000b, 2004; Fernandes et al., 2003; Ohno et al., 2007). Estos resultados concuerdan con los resultados del análisis del alperujo (Tabla V.8), corroborando que el residuo utilizado en este estudio posee un bajo grado de complejidad/humificación.

Si nos fijamos en la forma de los espectros de fluorescencia de la disolución de MOS tras ser tratada con las arcillas SWy-2 y  $\text{HT}_{500}$ , se observa un descenso de la fluorescencia, más pronunciado en el caso de la arcilla  $\text{HT}_{500}$ , y que puede atribuirse a la adsorción de la MOS a la materia mineral (Shen, 1999; Kaiser y Zech, 2000).

La muestra SWy-2, constituida mayoritariamente por montmorillonita, consigue disminuir principalmente el contenido de moléculas más complejas, en consonancia con la alta capacidad de una montmorillonita saturada en  $\text{Na}^+$  de adsorber moléculas de alto peso molecular observada por Torrents y Jayasumdera (1997). La muestra  $\text{HT}_{500}$  da lugar a una disminución más pronunciada y generalizada que la muestra SWy-2, reflejando su mayor poder adsorbente (Fig. V.16).

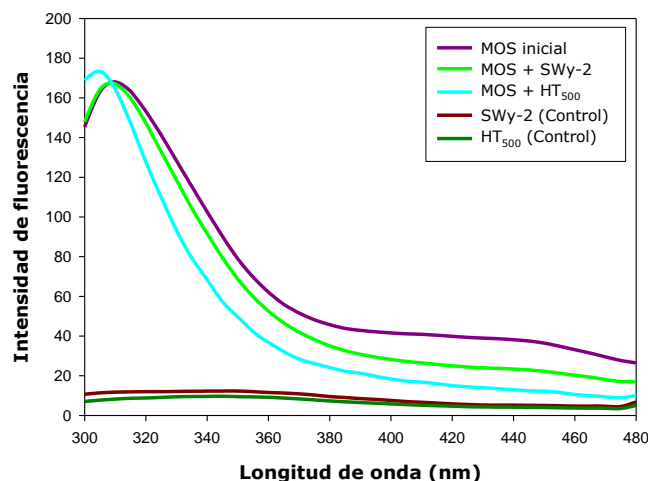


Fig. V.16. Espectros de fluorescencia de la MOS extraída del alperujo antes y después del tratamiento con las arcillas SWy-2 y  $\text{HT}_{500}$  a una relación sólido:disolución de 200 mg:8 ml.

#### e) Efecto Fitotóxico

Mediante la realización de un bioensayo, se pretendió ilustrar el efecto fitotóxico que puede ejercer la MOS procedente de alperujo y evaluar la capacidad de la muestra  $\text{HT}_{500}$  de reducir dicho efecto fitotóxico. La planta utilizada en el bioensayo fue *Lepidium sativum*, dicotiledónea, herbácea y anual, que se seleccionó por su elevada sensibilidad a la contaminación y por su rápida germinación (Maila y Cloete, 2002; Bogolte et al., 2007; Real, 2010).

La Fig. V.17 muestra el peso herbáceo fresco de las macetas transcurridas dos semanas desde la siembra de la planta en macetas sometidas a tres tratamientos diferentes: 1) macetas control (sin tratar), 2) macetas tratadas con la disolución de MOS sin diluir (100%) o diluida al 50, 10 ó 5% de su concentración inicial y 3) macetas tratadas con la disolución de MOS depurada con la arcilla  $\text{HT}_{500}$  sin diluir (100%) o tras diluirla al 50, 10 ó 5% de su concentración inicial.



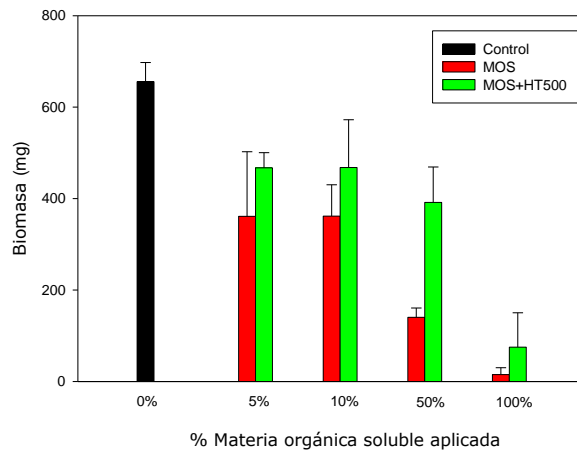


Fig. V.17. Peso herbáceo fresco de las macetas control, tratadas con MOS procedente de alperujo y tratadas con MOS depurada con la arcilla HT<sub>500</sub>.

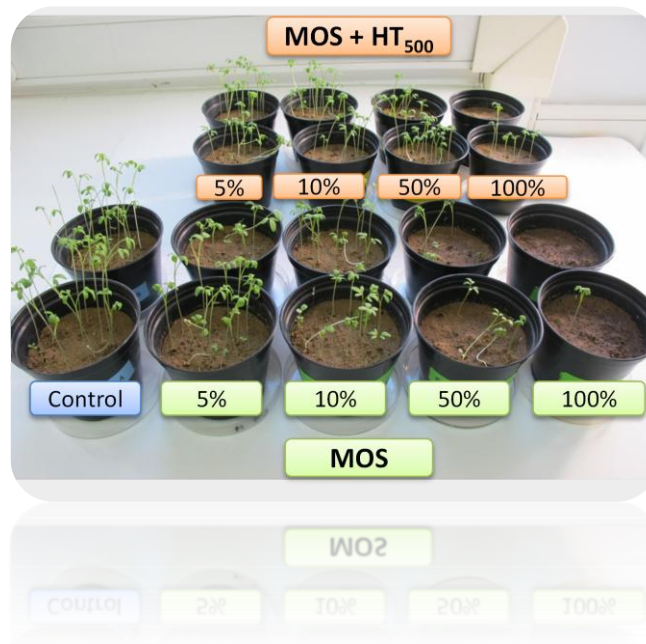


Fig. V.18. Estado de las macetas dos semanas después de la siembra.

La menor biomasa obtenida en las macetas tratadas con MOS respecto a las macetas control pone de manifiesto el efecto fitotóxico del extracto para la planta test. La inhibición del crecimiento aumenta al disminuir la dilución del

extracto hasta tal punto que la aplicación directa del extracto de MOS sin diluir (100%) llevó a una inhibición prácticamente total del crecimiento de la planta (Fig. V.17).

Para todas las concentraciones ensayadas, los extractos tratados con la arcilla HT<sub>500</sub> mostraron una menor fitotoxicidad en comparación con la de los extractos no tratados con la arcilla (Fig. V.17). En la Fig. V.17 puede observarse que este efecto fue particularmente pronunciado para los extractos diluidos al 50%, para los que la biomasa de las macetas tratadas con la disolución de MOS depurada fue unas tres veces superior a la biomasa de las macetas tratadas con la disolución de MOS sin depurar, es decir, sin tratar con la arcilla HT<sub>500</sub>. La Fig. V.18 muestra el aspecto que presentaban las macetas transcurridas dos semanas de experimento.

### V.3.2.2. Caracterización de los complejos arcilla-MOS

#### a) Color y Análisis Elemental

La decoloración de la disolución de MOS y disminución de la concentración del COT en la misma tras el tratamiento con las arcillas estuvo acompañada por la consiguiente coloración de las arcillas y aumento de sus contenidos en C y N (Fig. V.19 y Tabla V.11). Los datos de la Tabla V.11 indican que el contenido en C y N de los complejos arcilla-MOS obtenidos tienden a aumentar al disminuir la cantidad de arcilla añadida a la disolución de MOS, lo que es debido a que las arcillas se van saturando progresivamente con la MOS a bajas relaciones sólido:disolución. Es de destacar que los contenidos en C de los sólidos obtenidos proporcionan sólo una información limitada sobre la cantidad de MOS presente en los complejos, pues, en algunos casos, las arcillas originales presentaron contenidos considerables de C debido principalmente a la presencia de carbonato en las mismas: SWy-2 (0.3% de C), Bailén (4.7%), HTCO<sub>3</sub> (2.3%), HT<sub>500</sub> (1.2%).

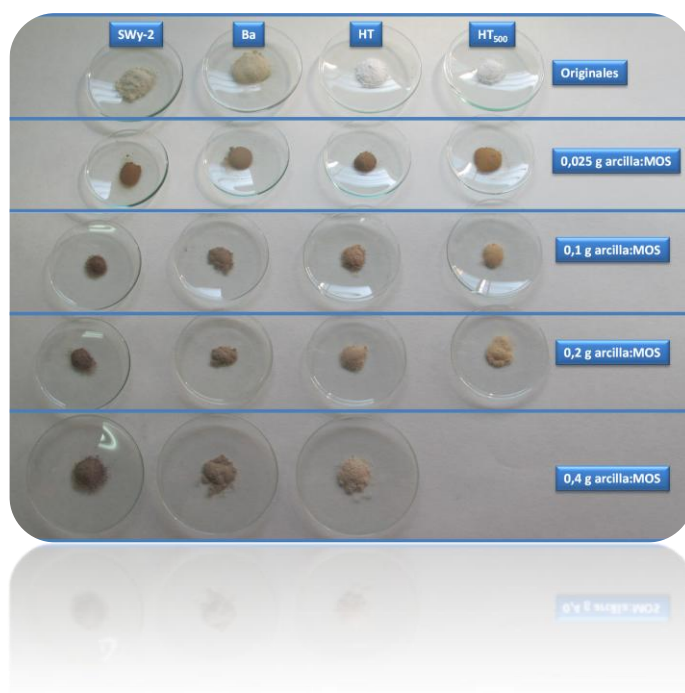


Fig. V.19. Imagen de las arcillas antes y después del tratamiento con la disolución de MOS procedente de alperujo.

Tabla V.11. Contenido en C y N de los complejos arcilla-MOS obtenidos.

Arcilla	Cantidad de arcilla añadida (mg)	C (%)	N (%)
SWy-2	25	9.31	0.72
SWy-2	100	4.14	0.17
SWy-2	200	2.49	0.11
SWy-2	400	2.40	0.07
Bailén	25	8.31	0.32
Bailén	100	7.00	0.18
Bailén	200	6.24	0.07
Bailén	400	5.76	0.06
HTCO <sub>3</sub>	25	10.71	0.62
HTCO <sub>3</sub>	100	8.67	0.29
HTCO <sub>3</sub>	200	6.96	0.21
HTCO <sub>3</sub>	400	5.98	0.17
HT <sub>500</sub>	25	9.48	0.40
HT <sub>500</sub>	100	10.04	0.29
HT <sub>500</sub>	200	6.76	0.16
HT <sub>500</sub>	400	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> n.d.: no determinada

**c) Difracción de Rayos X**

Los complejos arcilla-MOS obtenidos a una relación sólido:disolución de 25 mg:8 ml se seleccionaron para el análisis por difracción de rayos X por ser los de mayor contenido en MOS. Los difractogramas se obtuvieron en el rango de 2 a 20  $^{\circ}2\theta$  para determinar los cambios en el espaciado basal de las arcillas tras su interacción con la MOS, utilizando la técnica de agregados orientados secados al aire (Fig. V.20) y calentados a 200  $^{\circ}\text{C}$  (Fig. V.21).

La arcilla **SWy-2** original secada al aire muestra una difracción basal poco definida entre 12 y 15 Å, probablemente como consecuencia de la presencia de distintos cationes intercambiables en la interlámina (principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), con diferentes grados de hidratación. Tras interaccionar con la MOS, la difracción basal se vuelve ancha y se desplaza hasta centrarse en torno a los 16.7 Å, reflejando la expansión del espacio interlaminar (Fig. V.20A). El calentamiento a 200  $^{\circ}\text{C}$  hace colapsar las láminas de la arcilla original para dar un espaciado de 9.7 Å, mientras que el complejo SWy-2-MOS muestra cierta resistencia a colapsar manteniendo un elevado espaciado de 14.8 Å (Fig. V.21A). Estos datos indican que la adsorción de la MOS a SWy-2 ocurre con incorporación de componentes de la MOS al espacio interlaminar de la arcilla.

La arcilla de **Bailén** secada al aire presenta difracciones basales a 15.0 y 10.0 Å que se corresponden con la presencia de montmorillonita e illita/mica en la muestra. Tras interaccionar con la MOS, la difracción basal de illita permanece inalterada mientras que la de montmorillonita pierde definición (Fig. V.20B). Esto refleja la posible incorporación de algunos componentes de la MOS del alperujo al espacio interlaminar de montmorillonita dando una estructura poco ordenada. El calentamiento a 200  $^{\circ}\text{C}$  hace colapsar las láminas de montmorillonita, cuya difracción basal aparece junto con la de illita a 10 Å, mientras que el complejo Bailén-MOS refleja, al igual que en el caso de la arcilla SWy-2, una cierta resistencia al colapso, apoyando la formación de complejos interlaminares montmorillonita-MOS (Fig. V.21B).

La arcilla **HTCO<sub>3</sub>** secada al aire presenta una difracción basal centrada en torno a 7.6 Å que es compatible con la presencia de  $\text{CO}_3^{2-}$  y/o  $\text{OH}^-$  en el espacio interlaminar (Cavani et al., 1991) y que sufre un leve desplazamiento hasta 6.7 Å tras el calentamiento a 200  $^{\circ}\text{C}$  como consecuencia de la deshidratación de los aniones interlaminares (Figs. V.20C y V.21C). Estos valores no se alteran tras interaccionar con la MOS, lo que indica que la adsorción de la MOS a esta arcilla ocurre mayoritariamente sobre la superficie externa, con escasa o nula penetración interlaminar. Estos datos concuerdan con el hecho de que los iones carbonato presentan una afinidad muy elevada por el espacio interlaminar de las arcillas aniónicas y que, una vez que ocupa las posiciones de cambio, no son fácilmente desplazados por otras especies, haciendo el espacio interlaminar relativamente inaccesible (Celis et al., 1999b).

**Agregados Orientados secados al aire**

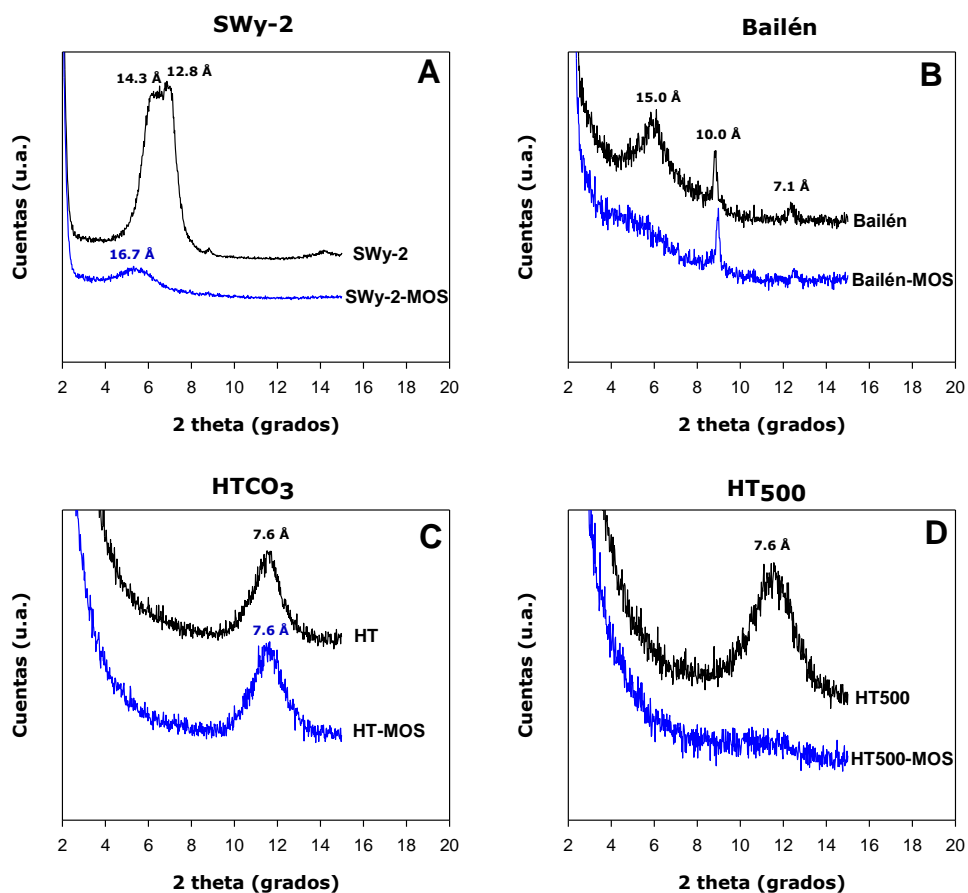


Fig. V.20. Difractogramas de rayos X de agregados orientados secados al aire de las muestras de arcilla antes y después de su interacción con MOS procedente de alperujo.

**Agregados Orientados calentados a 200 °C**

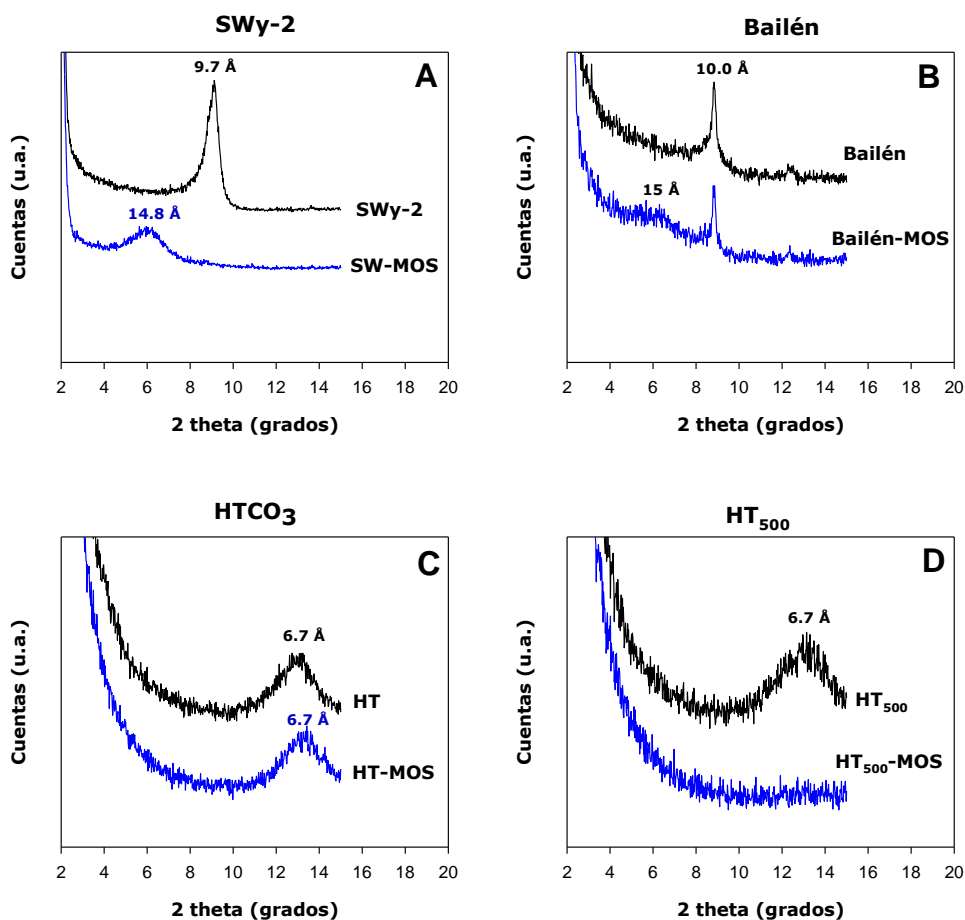


Fig. V.21. Difractogramas de rayos X de agregados orientados calentados a 200 °C de las muestras de arcilla antes y después de su interacción con MOS procedente de alperujo.

Por último, la muestra **HT<sub>500</sub>** sin tratar presenta difracciones basales prácticamente idénticas a las de la muestra HTCO<sub>3</sub>. Esto es debido a que al preparar el agregado orientado de HT<sub>500</sub>, la muestra se rehidrata recuperando la estructura laminar de la hidrotalcita, dando espaciados de 7.6 Å a temperatura ambiente y de 6.7 Å tras calentar a 200 °C (Fig. V.20D y V.21D). Los difractogramas de los complejos HT<sub>500</sub>-MOS revelan la desaparición de la difracción basal, lo que podría reflejar el hecho de que la MOS impide la reconstrucción de la estructura laminar de la hidrotalcita o que ésta ocurre dando una estructura desordenada de las láminas sin espaciado basal definido.

#### d) Espectroscopia de Infrarrojos

La Fig. V.22 muestra el espectro de infrarrojos de la MOS liofilizada procedente del alperujo y la asignación de bandas según Bellamy (1975). Las bandas más destacadas se encuentran a  $1739\text{ cm}^{-1}$ , que se corresponde con la absorción C=O de grupos carboxílicos protonados (-COOH) (Cox et al., 2004) y/o de grupos éster (Baddi et al., 2004), y a  $1596\text{ cm}^{-1}$ , que se puede atribuir a las vibraciones C-O de grupos carboxilato (-COO<sup>-</sup>) (Bellamy, 1975). Estos datos indican que al bajo pH del alperujo utilizado podrían coexistir grupos carboxílicos protonados y sin protonar. Destacan, por otra parte, la banda en torno a  $3400\text{ cm}^{-1}$ , que puede atribuirse a vibraciones de tensión de grupos O-H (hidróxicos, fenólicos, carboxílicos o de agua de hidratación) y N-H (aminas y amidas), la banda a  $1540\text{ cm}^{-1}$ , que podría corresponder a estructuras peptídicas (amida II), la banda cercana a  $1500\text{ cm}^{-1}$ , que se puede atribuir a las vibraciones de los anillos aromáticos, y bandas en la región de  $2900\text{ cm}^{-1}$ , que revela alguna presencia de grupos alquílicos (Baddi et al., 2004).

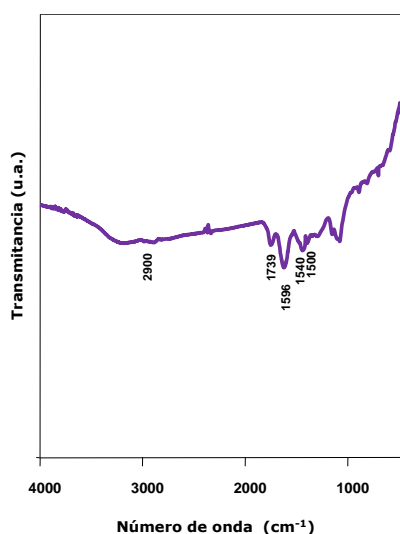


Fig. V.22. Espectro de infrarrojos del extracto de MOS liofilizado del alperujo.

El espectro de la muestra **SWy-2** presenta las bandas características de la montmorillonita, con las vibraciones de tensión de los grupos O-H estructurales a  $\sim 3625\text{ cm}^{-1}$ , las vibraciones O-H del agua de hidratación  $\nu_{\text{OH}}$  a  $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$  y  $\delta_{\text{OH}}$  a  $1630\text{ cm}^{-1}$  y las vibraciones de los grupos Si-O estructurales de la arcilla cerca de  $1000\text{ cm}^{-1}$  (Fig. V.23A). En el complejo SWy-2-MOS se identificaron estas mismas bandas y, además, bandas atribuibles a vibraciones de tensión C-H alifáticos ( $2930\text{ cm}^{-1}$ ), a grupos carboxílicos protonados ( $1716\text{ cm}^{-1}$ ) y a alcoholes y fenoles ( $1450$  y  $1386\text{ cm}^{-1}$ ), poniendo así de manifiesto la presencia de la MOS adsorbida en la arcilla.

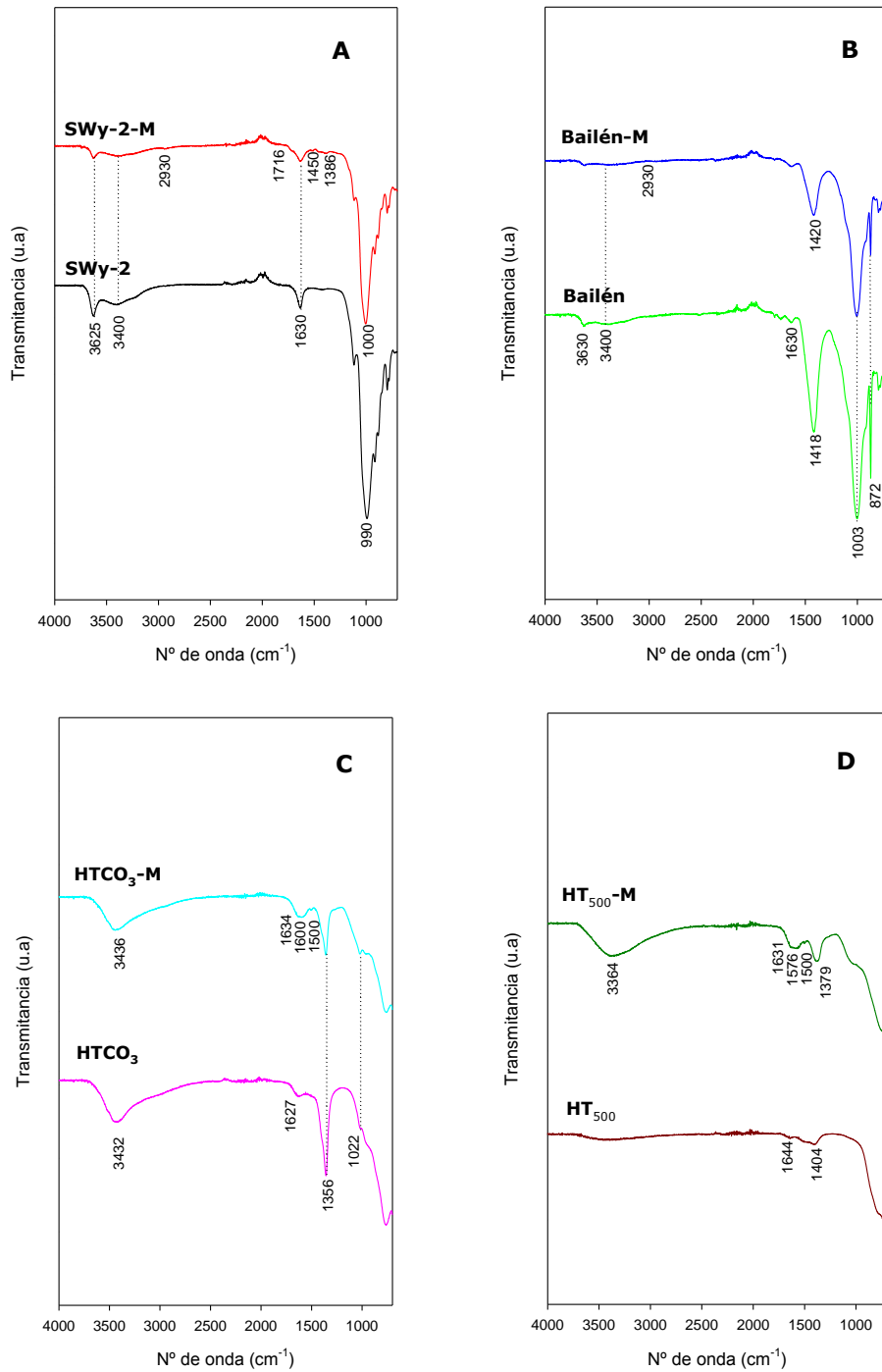


Fig. V.23. Espectros de infrarrojos de las arcillas sin tratar y tratadas con MOS procedente del alperujo



El espectro de la arcilla de **Bailén** presentó características similares al de la arcilla SWy-2, es decir, bandas a 3630, 3400, 1630 y 1003  $\text{cm}^{-1}$ , atribuibles a la presencia de montmorillonita (y cuarzo) en la muestra junto con su agua de hidratación (Fig. V.23B). Los carbonatos suelen presentar una fuerte banda en torno a 1490-1410  $\text{cm}^{-1}$  y una banda de una intensidad media en torno a 880-860  $\text{cm}^{-1}$  (Bellamy, 1975). Por tanto, las banda que aparecen en el espectro de la arcilla de Bailén a 1418  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) y 872  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ ) pueden atribuirse a los carbonatos, coincidiendo con el elevado porcentaje de carbonatos que contiene la muestra (Tabla V.4). En el complejo Bailén-MOS las bandas correspondientes a MOS fueron difíciles de identificar debido al escaso poder adsorbente de la arcilla, destacando la banda a 2930  $\text{cm}^{-1}$  atribuible a grupos alquílicos de la MOS (Fig. V.23B).

Los espectros de infrarrojos de las muestras **HTCO<sub>3</sub>** original y HTCO<sub>3</sub>-MOS (Fig. V.23C), presentan una banda ancha próxima a 3435  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración de tensión de los grupos hidroxilos del mineral y del agua adsorbida, cuya vibración de flexión,  $\delta_{\text{OH}}$ , se observa a 1627  $\text{cm}^{-1}$ . La banda a 1356  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al modo vibracional de tensión  $\nu_3$  del ión carbonato (Rives, 2001; Barriga et al., 2002). Las vibraciones Mg-O y Al-O, así como los modos de vibración  $\nu_2$  y  $\nu_4$  del carbonato, aparcan por debajo de 1000  $\text{cm}^{-1}$  (Barriga et al., 2002). En el espectro de la muestra HTCO<sub>3</sub>-MOS destaca la presencia de una banda muy ancha centrada en torno a 1600  $\text{cm}^{-1}$ . Es probable que, dada la carga laminar positiva de los materiales tipo hidrotalcita y su carácter básico, la adsorción de la MOS haya podido ocurrir a través de los grupos carboxílicos desprotonados de la MOS, lo que explicaría la aparición de esta banda a 1600  $\text{cm}^{-1}$  (Bellamy, 1975), cuya anchura podría reflejar la presencia de grupos carboxilato con diferentes grados de interacción con la superficie de la arcilla aniónica.

El espectro de la muestra **HT<sub>500</sub>** corresponde al producto calcinado de la muestra HTCO<sub>3</sub> (Fig. V.23D). El espectro refleja la pérdida casi total del agua adsorbida y la deshidroxilación y descarbonatación del material. Se observaron pequeños hombros en la región de 1644  $\text{cm}^{-1}$  y 1404  $\text{cm}^{-1}$ , que se pueden atribuir a pequeñas cantidades de agua y carbonato adsorbidas por la muestra tras exponerla al aire (Barriga et al., 2002; Costa et al., 2008).

La muestra HT<sub>500</sub>-MOS presenta bandas semejantes a las obtenidas anteriormente en la muestra HTCO<sub>3</sub>: vibración de tensión de grupos hidroxilos a 3365  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\delta_{\text{OH}}$  de agua adsorbida a 1631  $\text{cm}^{-1}$  y vibración de tensión del ión carbonato ( $\nu_3$ ) a 1379  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. V.23D). Esto es debido a que, en contacto con la disolución de MOS, la muestra HT<sub>500</sub> se rehidrata recuperando una estructura tipo hidrotalcita, similar a la de la muestra HTCO<sub>3</sub>. El espectro de la muestra HT<sub>500</sub>-MOS vuelve a mostrar una banda ancha centrada en torno a 1576  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. V.23D) que, al igual que en el caso del complejo HTCO<sub>3</sub>-MOS, sugiere la asociación de la MOS a la arcilla como especies aniónicas, probablemente incorporadas al material en el transcurso de su rehidratación.

### e) Resonancia Magnética Nuclear

Las asignaciones de los picos de los espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR de las muestras sólidas están referenciados al tetrametilsilano (0 ppm). En la Tabla V.12 se presentan las asignaciones de los picos obtenidos en los espectros, para determinar qué tipo de C emite la señal de intensidad en determinadas regiones (Knicker, 2011).

Tabla V.12. Regiones en las que aparecen distintos tipos de C en los espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR.

ppm	Asignación de la regiones
0-45	C-alquilo
45-110	O-y N-alquilo
110-160	Grupos aromáticos
160-220	C Carboxilo

En la Fig. V.24 se muestran los espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR de las muestras SWy-2-MOS y HT<sub>500</sub>-MOS. Se registraron también los espectros de muestras control consistentes en las mismas arcillas (25 mg) sobre las que se había depositado la totalidad de la MOS presente en 8 ml de extracto mediante un proceso de liofilización.

Los espectros de las muestras control y de las muestras SWy-2-MOS y HT<sub>500</sub>-MOS, son muy similares, por lo que la MOS adsorbida en las arcillas es muy representativa de la totalidad que encontramos en las muestras control.

En todas las muestras predomina una señal fuerte en la región de desplazamiento químico entre 50 y 100 ppm, que se puede asignar a hidratos de carbono derivados principalmente de celulosa y biomasa bacteriana. Se observa una alta intensidad en la región de C alquilo (0-45 ppm) y en la región del C carboxílico (160 a 220 ppm), lo que se puede relacionar con un bajo estado de degradación de la MOS, concordando con el estado del alperujo del que fue extraída, ya que presentaba una baja madurez.

Hay que destacar unas pequeñas diferencias entre las muestras control y los complejos arcilla-MOS. En las muestras control aparecen unos picos en las regiones de 40 y 100 ppm, presentando una mayor intensidad que en los complejos. El pico que encontramos en la región de 40 ppm se puede asignar a grupos metilénicos en anillos y cadenas alifáticas y grupos metílicos terminales. El pico en la región de 100 ppm podría relacionarse con carbohidratos de hexosas, carbonos de lignina, C<sub>α</sub> de algunos aminoácidos y alcoholes de elevado peso molecular (Panettieri, 2013). Estas diferencias indican una mayor presencia relativa de estos grupos en las muestras control.

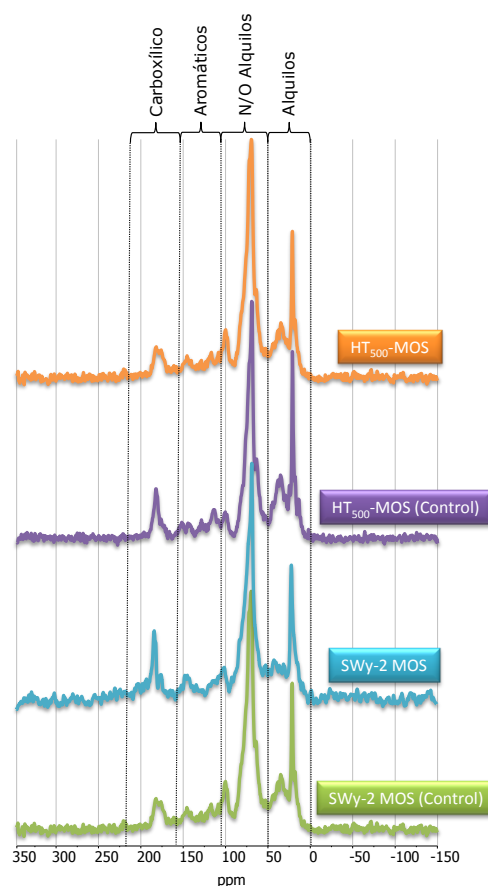


Fig. V.24. Espectros de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  (estado sólido) de complejos SWy-2-MOS y HT<sub>500</sub>-MOS.

### V.3.3. Evaluación de los complejos arcilla-MOS como adsorbentes de plaguicidas

A continuación se muestran los resultados obtenidos en los estudios de adsorción de los plaguicidas y el dibenzofurano a los complejos arcilla-MOS. Concretamente, se seleccionaron los complejos obtenidos a una relación sólido-disolución de 25 mg:8 ml por su mayor contenido en MOS y se utilizaron disoluciones acuosas de los distintos plaguicidas a una concentración de 1 mg/l para todos los experimentos de adsorción. A continuación se discuten los resultados de forma individual para cada plaguicida estudiado.

### **Diurón**

En la Fig. V.25 se muestran los resultados de adsorción del herbicida polar no ionizable diurón a las arcillas de partida, que se toman como blancos, y a los complejos arcilla-MOS sintetizados para este estudio.

La pequeña adsorción observada sobre las muestras de arcilla originales se explica por las características físico-químicas del plaguicida (neutro-polar), siendo un compuesto que contiene grupos funcionales polares que interaccionan con el agua de hidratación de los iones de cambio de las arcillas catiónicas y aniónicas, y que contiene también partes completamente hidrófobas que podrían interaccionar con las regiones más hidrófobas de las superficies basales de SWy-2.

Excepto para la muestra  $\text{HTCO}_3$ , la adsorción de diurón no aumenta significativamente por la presencia de MOS adsorbida a las arcillas, probablemente: 1) por una baja afinidad del herbicida por la MOS, ó 2) porque el posible aumento en la adsorción por la presencia de MOS haya sido compensado por un bloqueo de sitios de los adsorción en las superficies minerales.

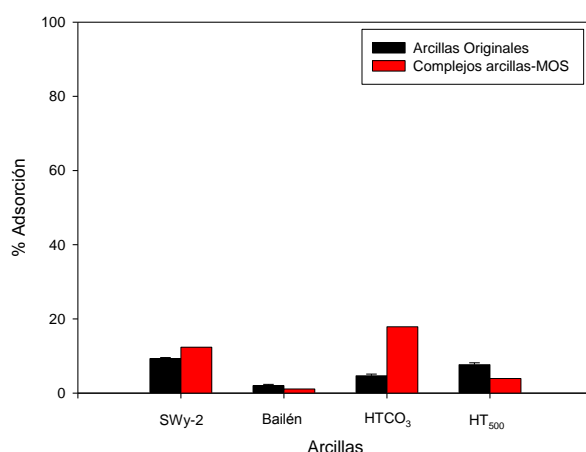


Fig. V.25. Porcentajes de adsorción de diurón sobre las distintas muestras de arcilla y los complejos arcilla-MOS.

En la Tabla V.13 se muestran los valores de pH inicial y de equilibrio y los coeficientes de distribución obtenidos en los experimentos de adsorción de diurón. El pH final de los complejos arcilla-MOS es inferior que el pH final de las arcillas originales de partida. El descenso del pH puede provocar que para

muchos plaguicidas aumente su capacidad adsortiva a la montmorillonita, pero como se muestra en la Tabla V.13, esto no ocurre en el caso del diurón, por tratarse de un herbicida no ionizable.

Tabla V.13. Valores de pH inicial y en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción del diurón a las arcillas de partida y a los complejos arcilla-MOS, a una concentración inicial de plaguicida 1 mg/l y una relación sólido:disolución de 20 mg:8 ml.

Muestra	pH inic	pH eq	Kd (l/kg)
SWy-2	5.9	9.6	16.6 ± 0.5
SWy-2-MOS	5.9	6.8	22.6 ± 2.2
Bailén	5.9	8.0	3.3 ± 0.5
Bailén-MOS	5.9	7.6	1.8 ± 0.2
HTCO <sub>3</sub>	5.9	8.1	7.9 ± 0.8
HTCO <sub>3</sub> -MOS	5.9	7.5	34.8 ± 3.5
HT <sub>500</sub>	5.9	9.5	13.3 ± 0.9
HT <sub>500</sub> -MOS	5.9	8.3	6.6 ± 0.7

### **Terbutilazina y Terbutrina**

En la Fig. V.26 se muestra el porcentaje de adsorción de los herbicidas básicos terbutilazina ( $pK_a=1.9$ ) y terbutrina ( $pK_a=4.3$ ) a las distintas arcillas y complejos arcilla-MOS. Para las arcillas originales se aprecia una baja adsorción de los herbicidas, debida probablemente a la interacción de éstos con los hidrógenos polarizados del agua de hidratación de los iones de cambio de las arcillas (Celis et al., 1997b). Esta interacción no ocurre en la arcilla de Bailén debido a la mayor heterogeneidad en su composición y, tal vez, a una mayor densidad de carga superficial de sus esmectitas, que dificultaría la entrada de las triazinas en el espacio interlamilar (Celis et al., 1997b).

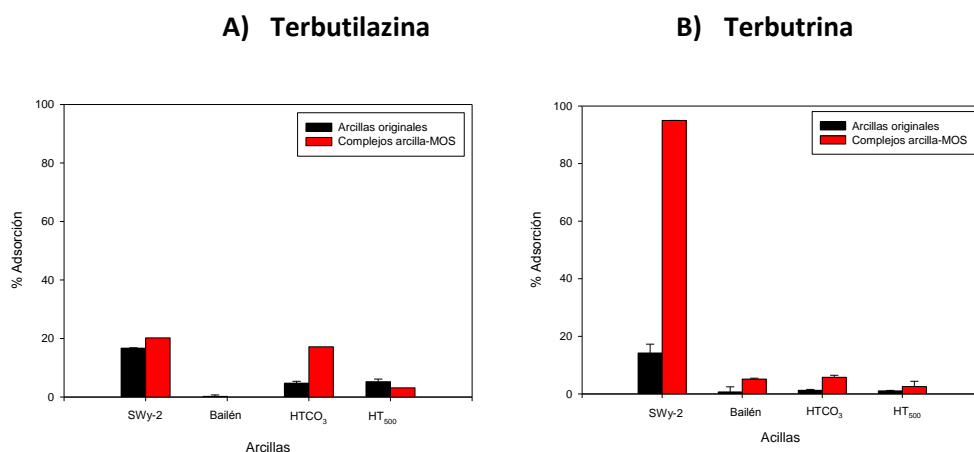


Fig. V.26. Porcentajes de adsorción de terbutilazina (A) y terbutrina (B) sobre las distintas arcillas de partida y los complejos arcilla-MOS.

En el caso de los complejos arcilla-MOS el comportamiento de terbutilazina es similar al que se observó para el diurón, mientras que destaca el aumento de la adsorción de terbutrina a la arcilla SWy-2 tras su interacción con la MOS (Tablas V.14 y V.15). Este comportamiento se puede explicar por el  $pK_a$  de la molécula de terbutrina ( $pK_a = 4.3$ ) y el descenso del pH que provoca la MOS adsorbida en la arcilla SWy-2, que posibilita la protonación del herbicida y su adsorción por fuerzas electrostáticas tanto al mineral de la arcilla como a los grupos ácidos de la MOS.

Aunque el pH del equilibrio de la suspensión (6.7) (Tabla V.15) estuvo por encima del  $pK_a$  (4.9) del herbicida, se sabe que el pH en las inmediaciones de las superficies esmectíticas puede llegar a ser hasta 2-3 unidades inferior al del seno de la disolución (Bailey et al., 1968; Celis et al., 1997b). Además, los grupos ácidos de la MOS podrían haber catalizado la protonación del herbicida facilitando su adsorción como especies protonadas (Huang et al., 1984).

Tabla V.14. Valores de pH inicial y en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de terbutilazina a las arcillas de partida y a los complejos arcilla-MOS, a una concentración inicial de plaguicida de 1 mg/l y una relación sólido:disolución de 20 mg:8 ml.

Muestra	pH <sub>inic</sub>	pH <sub>eq</sub>	Kd (l/kg)
SWy-2	5.9	9.6	32.3 ± 0.3
SWy-2-MOS	5.9	6.8	40.6 ± 4.0
Bailén	5.9	8.1	0.4 ± 0.8
Bailén-MOS	5.9	7.6	0
HTCO <sub>3</sub>	5.9	8.1	7.9 ± 1.2
HTCO <sub>3</sub> -MOS	5.9	7.5	33.2 ± 3.3
HT <sub>500</sub>	5.9	9.5	8.9 ± 1.6
HT <sub>500</sub> -MOS	5.9	8.3	5.2 ± 0.5

Tabla V.15. Valores de pH inicial y en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de terbutrina a las arcillas de partida y a los complejos arcilla-MOS, a una concentración inicial de plaguicida de 1 mg/l y una relación sólido:disolución de 20 mg:8 ml.

Muestra	pH inic	pH eq	Kd (l/kg)
SWy-2	6.2	9.2	66.9 ± 16.8
SWy-2-MOS	6.2	6.7	7567.4 ± 17.6
Bailén	6.2	8.7	10.1 ± 7.2
Bailén-MOS	6.2	7.8	21.8 ± 1.3
HTCO <sub>3</sub>	6.2	8.8	5.1 ± 1.3
HTCO <sub>3</sub> -MOS	6.2	7.7	24.6 ± 3.1
HT <sub>500</sub>	6.2	9.8	4.3 ± 0.6
HT <sub>500</sub> -MOS	6.2	9.0	10.6 ± 7.7

### Dibenzofurano

El dibenzofurano se eligió como modelo de contaminante neutro y muy hidrofóbico por la conocida afinidad que presentan este tipo de compuestos por la materia orgánica del suelo. Tiene un  $\log K_{ow} > 4$ , que es considerablemente mayor que el del resto de compuestos estudiados anteriormente. Los resultados de los experimentos de adsorción se muestran en la Fig. V.27. En las muestras de arcilla originales la adsorción no llega a superar el 15%. Su alta hidrofobicidad limita la adsorción del dibenzofurano a las muestras, adsorbiéndose sólo por las atracciones hidrofóbicas con algunas regiones de las arcillas catiónicas y alguna contribución polar con participación del heteroátomo.

Cuando se ponen en contacto los complejos arcilla-MOS con el dibenzofurano se observa una mejora significativa en el porcentaje de adsorción que llega a alcanzar un 50% para la muestra SWy-2-MOS (Fig. V.27). Se relaciona este aumento en la capacidad adsortiva con las atracciones hidrofóbicas entre el dibenzofurano y la MOS asociada a las arcillas.

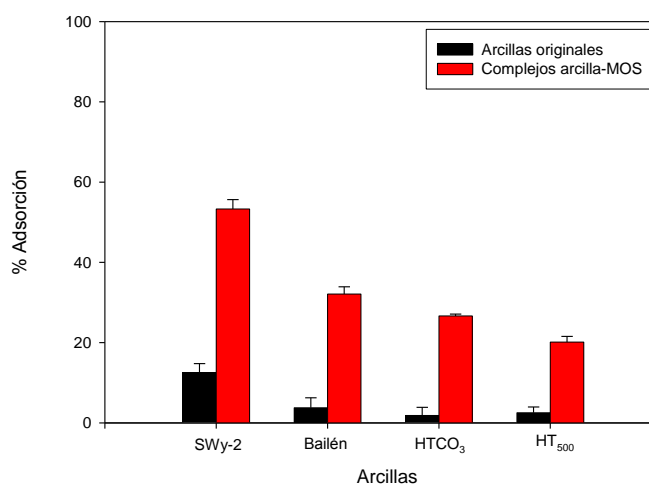


Fig. V.27. Porcentajes de adsorción del dibenzofurano sobre las distintas muestras de arcilla y los complejos arcilla-MOS.

En la Tabla V.16 se muestran los valores de pH inicial de la disolución de dibenzofurano, el pH de equilibrio de la suspensión y los coeficientes de distribución ( $K_d$ ). Al tratarse de un compuesto con una solubilidad en agua muy baja (Tabla V.2) y neutro, el aumento que muestran los valores de  $K_d$  equivale a la mejora de la capacidad adsortiva de los complejos frente al dibenzofurano por el establecimiento de interacciones hidrofóbicas.

Tabla V.16. Valores de pH inicial y en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de dibenzofurano a las arcillas de partida y a los complejos arcilla-MOS, a una concentración inicial de dibenzofurano de 1 mg/l y una relación sólido:disolución de 20 mg:8 ml.

Muestra	pH inic	pH eq	Kd (l/kg)
SWy-2	6.0	9.6	58 ± 11
SWy-2-MOS	6.4	6.8	457 ± 154
Bailén	6.0	8.9	15 ± 11
Bailén MOS	6.4	8.2	188 ± 63
HT	6.0	8.7	6 ± 9
HT MOS	6.4	7.5	144 ± 48
HT <sub>500</sub>	6.0	9.9	9 ± 6
HT <sub>500</sub> MOS	6.4	8.5	100 ± 34

En resumen, podemos concluir que los complejos formados por la interacción de la MOS con las arcillas pueden tener una afinidad variable por compuestos orgánicos de interés agroquímico, la cual va a depender en gran medida de la naturaleza del compuesto. Compuestos protonables o con una elevada hidrofobicidad podrían ser los más propensos a adsorberse a los complejos con lo que verían reducida su movilidad en el suelo.

#### V.3.4. Evaluación de los complejos formados in situ en presencia de suelo como adsorbentes de plaguicidas

Una vez obtenidos los resultados de adsorción de los complejos arcilla-MOS, se diseñó un experimento para evaluar su comportamiento como adsorbentes en presencia de un suelo. Seleccionando los compuestos terbutrina y dibenzofurano para los estudios de adsorción, se prepararon disoluciones de una concentración de 1 mg/l en ambos casos, bien en agua desionizada bien en la disolución de MOS extraída del alperujo. Posteriormente, se añadieron al suelo sin enmendar o enmendado al 10% con las diferentes arcillas y se calcularon los coeficientes de distribución para la adsorción de los compuestos en cada caso. En las Tablas V.17 y V.18 y en la Fig. V.28 se muestran los resultados obtenidos para terbutrina.

La **terbutrina** se adsorbe un 6% al suelo original (Fig. V.28), lo que supone un valor de Kd de 1.1 l/kg (Tabla V.17). Comparando este resultado con los obtenidos para el suelo enmendado al 10% con las arcillas de partida se puede observar cómo en la mayoría de los casos se obtiene un valor de adsorción semejante, exceptuando para la muestra SWy-2 que aumenta la adsorción significativamente (Tabla V.17 y Fig. V.28).



Tabla V.17. Valores de pH inicial y en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de terbutrina al suelo sin enmendar y enmendado con las arcillas de partida a una concentración inicial de plaguicida de 1 mg/l (**acuosa**) y una relación sólido:disolución de (0.5 g suelo + 0.05 g arcilla):8 ml.

Muestra	pH inic	pH eq	Kd (l/kg)
0.5 g Suelo 2 sin enmendar	6.3	8.3	1.1 ± 0.1
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g SWy-2	6.3	9.5	5.1 ± 0.1
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g Bailén	6.3	8.6	1.0 ± 0.1
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6.3	8.6	0.9 ± 0.1
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g HT <sub>500</sub>	6.3	11.7	0.7 ± 0.1

En la Tabla V.18 se muestran los coeficientes de distribución para la adsorción de la terbutrina preparada en la disolución de MOS. El suelo presenta un bajo Kd, que no sufre mucha variación en presencia de las arcillas Bailén, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y HT<sub>500</sub>, por lo que la adición de estas arcillas no mejora la adsorción de la terbutrina en presencia de MOS respecto al suelo original. La arcilla SWy-2, en cambio, provoca un aumento significativo, demostrando una mejoría considerable en la adsorción de terbutrina en presencia de MOS respecto al suelo sin enmendar.

Tabla V.18. Valores de pH inicial y en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de terbutrina al suelo sin enmendar y enmendado con una concentración inicial de 1 mg/l (**MOS**) y una relación sólido:disolución de (0.5 g suelo + 0.05 g arcilla):8 ml.

Muestra	pH inic	pH eq	Kd (l/kg)
0.5 g Suelo 2 sin enmendar	4.9	6.4	3.0 ± 0.0
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g SWy-2	4.9	6.5	35.1 ± 0.1
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g Bailén	4.9	6.5	4.6 ± 0.1
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4.9	7.3	1.9 ± 0.1
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g HT <sub>500</sub>	4.9	9.3	1.4 ± 0.1

En la Fig. V.28 se comparan los porcentajes de adsorción de terbutrina al suelo 2 sin enmendar y enmendado con las arcillas, en presencia y ausencia de MOS. La muestra SWy-2 en presencia de MOS provoca un aumento considerable en la capacidad adsorptiva de terbutrina, confirmando los resultados obtenidos anteriormente en los estudios en los que se utilizó el complejo SWy-2-MOS como adsorbente (Tabla V.15).

Las muestras se comportan de forma consistente en presencia o ausencia de este tipo de suelo, por lo que podrían ser unos adsorbentes eficaces para prevenir posibles contaminaciones de aguas o suelos por este tipo de plaguicida en presencia de altas concentraciones de MOS.

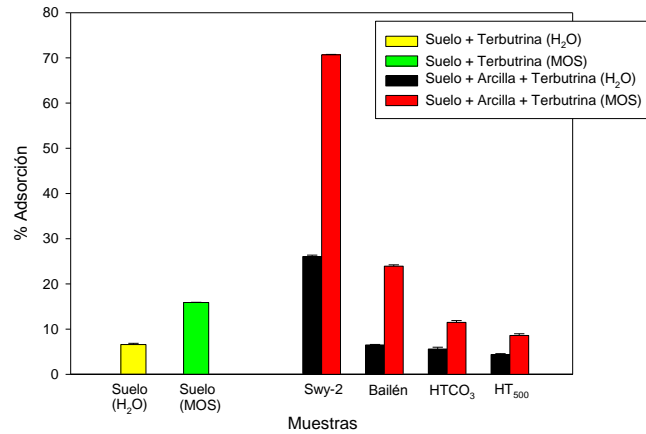


Fig. V.28. Porcentajes de adsorción de la terbutrina sobre el suelo 2 sin enmendar y enmendado con arcillas en presencia y ausencia de MOS.

En el caso del **dibenzofurano** también se realizaron estudios de adsorción utilizando el suelo 2 y disoluciones de dibenzofurano tanto en agua como en MOS añadidas al suelo sin enmendar o enmendado con las arcillas (Fig. V.29 y Tablas V.19 y V.20).

La muestra SWy-2, en presencia de la disolución de MOS, provoca el mayor aumento en la adsorción de dibenzofurano, siendo el aumento debido a la asociación de la MOS a la arcilla, mientras que en las otras arcillas este aumento es algo menor. En ausencia de MOS, las arcillas no aumentan la adsorción de dibenzofurano, por lo que las atracciones hidrofóbicas que presenta el dibenzofurano con el suelo son claramente superiores a la posible capacidad adsorptiva que presentan las arcillas por sí mismas.

Tabla V.19. Valores de pH inicial y en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de dibenzofurano al suelo sin enmendar y enmendado con las arcillas de partida a una concentración inicial de dibenzofurano de 1 mg/l (**acuosa**) y una relación sólido:disolución de (0.5 g suelo + 0.05 g arcilla):8 ml.

Muestra	pH inic	pH eq	Kd (l/kg)
0.5 g Suelo 2 sin enmendar	6.4	8.1	9.7 ± 0.8
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g SWy-2	6.4	9.4	9.1 ± 0.4
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g Bailén	6.4	8.5	6.4 ± 0.3
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g HTCO <sub>3</sub>	6.4	8.6	7.5 ± 0.6
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g HT <sub>500</sub>	6.4	11.6	7.6 ± 0.6

Tabla V.20. Valores de pH inicial y en el equilibrio y coeficientes de distribución para la adsorción de dibenzofurano al suelo sin enmendar y enmendado con las arcillas de partida, a una concentración inicial de dibenzofurano de 1 mg/l (**MOS**) y una relación sólido:disolución de (0.5 g suelo + 0.05 g arcilla):8 ml.

Muestra	pH inic	pH eq	Kd (l/kg)
0.5 g Suelo 2 sin enmendar	4.9	6.2	11.6 ± 0.6
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g SWy-2	4.9	6.3	20.7 ± 0.5
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g Bailén	4.9	6.4	12.4 ± 0.7
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4.9	7.4	11.9 ± 0.4
0.5 g Suelo 2 + 0.05 g HT <sub>500</sub>	4.9	9.4	14.0 ± 0.6

En la Fig. V.29 se muestra cómo el suelo 2 por sí solo presenta una capacidad de adsorción del 36% de dibenzofurano en disolución acuosa. El dibenzofurano preparado en una disolución de MOS se adsorbe hasta un 42% al mismo suelo, lo que supone un aumento del 6% respecto a su adsorción en ausencia de MOS.

Para el suelo enmendado con SWy-2 se aprecia una mejora en la adsorción de dibenzofurano de hasta el 20% en presencia de MOS. Las atracciones hidrofóbicas entre la MOS presente en el complejo arcilla-MOS formado "in situ" favorece significativamente la capacidad de adsorción para este tipo de compuesto. Por esta razón, en todas las muestras en presencia de MOS, aumenta el porcentaje de adsorción.

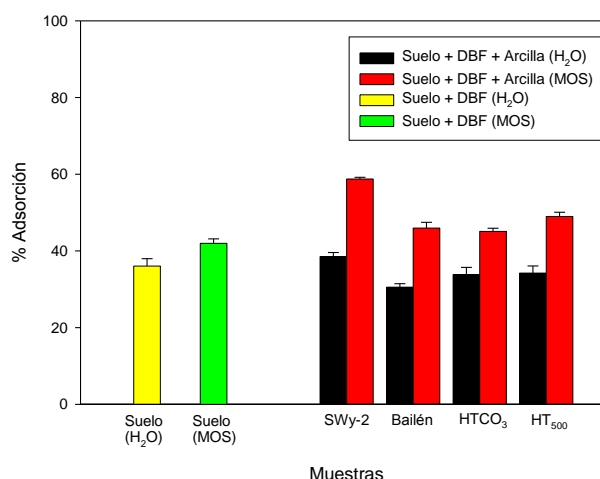


Fig. V.29. Porcentajes de adsorción de dibenzofurano sobre el suelo 2 sin enmendar y enmendado con arcillas en presencia y ausencia de MOS.

#### V.4. CONSIDERACIONES FINALES

- La caracterización de las arcillas de partida puso de manifiesto que, de las arcillas catiónicas empleadas, la montmorillonita de Bailén presentaba una composición más heterogénea que la arcilla de referencia SWy-2 y que la arcilla aniónica presentaba una menor cristalinidad que la obtenida en condiciones convencionales de síntesis. La superficie específica medida por adsorción de nitrógeno de las arcillas aniónicas resultó ser muy superior que la de las catiónicas. La caracterización del alperujo reveló una baja humificación, bajo pH y elevado contenido en carbono orgánico soluble debido a su bajo grado de madurez.
- La capacidad adsorbente de las arcillas para la MOS procedente del alperujo se evaluó poniendo en contacto distintas cantidades de arcilla con la disolución de MOS, para posteriormente caracterizar tanto los sobrenadantes como los complejos arcilla-MOS formados.
  - ✓ Según los resultados obtenidos en la caracterización de los sobrenadantes, se determinó que las arcillas aniónicas presentaban una mayor afinidad y capacidad adsorptiva por la MOS que las arcillas catiónicas, de acuerdo con el orden: Bailén < SWy-2 < HTCO<sub>3</sub> < HT<sub>500</sub>. El efecto fitotóxico que presenta la MOS procedente del alperujo se redujo cuando ésta se trató con la arcilla aniónica calcinada HT<sub>500</sub>, que fue capaz de eliminar más del 75% del carbono orgánico disuelto de la disolución de MOS a una relación sólido:disolución de 200 mg:8 ml.
  - ✓ Para los complejos arcilla-MOS se demostró cómo aumentaba el contenido de C y N de las arcillas y su coloración debido a la adsorción de MOS y se comprobó que la MOS adsorbida era, en general, bastante representativa de la inicial en su conjunto.
- Los complejos formados por la interacción de la MOS con las arcillas pueden presentar una afinidad variable frente a compuestos orgánicos de interés agroquímico, que dependerá de la naturaleza del compuesto considerado. Los compuestos altamente hidrofóbicos y/o protonables podrían ser los más propensos a adsorberse a los complejos, con lo que verían reducida su movilidad en el suelo en presencia de altas concentraciones de MOS tras la adición de las arcillas.





## **VI. Conclusiones Generales/General Conclusions**

---

---



A partir de las consideraciones finales desarrolladas en los correspondientes capítulos que tratan los distintos sistemas organo-arcillosos estudiados, pueden establecerse las siguientes conclusiones generales:

- **Sistemas montmorillonita-quitosano:**

1. El biopolímero quitosano se intercala en el espacio interlaminar de la montmorillonita y también se asocia en parte a su superficie externa, dando lugar a cambios estructurales, morfológicos y superficiales que provocan un aumento en su capacidad de adsorción para distintos plaguicidas con respecto a la arcilla sin modificar.
2. El aumento de la capacidad de adsorción por asociación del biopolímero a la arcilla depende de forma muy relevante del pH del medio y del tipo de plaguicida, ya que en la interacción de éstos con los complejos se combinan en distinta proporción fuerzas iónicas, polares e hidrofóbicas, según el plaguicida de que se trate. Los mayores aumentos de adsorción se observan: a) a pH neutro para plaguicidas ácidos, básicos y polares de mediana o baja solubilidad en agua (imazetapir, terbutilazina y metalaxil), y b) a pH ácido para los plaguicidas de carácter ácido y alta solubilidad en agua (clopiralida e imazetapir).
3. Los complejos montmorillonita-quitosano muestran una buena adsorción de clopiralida en agua en medio ácido, actúan de enmendantes en suelos ácidos aumentando la retención de este herbicida e igualmente se muestran eficaces en formulaciones disminuyendo las pérdidas por lixiviación de este herbicida, especialmente en condiciones de alto riesgo de lluvia abundante y en suelos ácidos. En suelos neutros su eficacia disminuye.

- **Sistemas hidrotalcita-ácidos grasos insaturados:**

4. La interacción de diversos ácidos grasos insaturados (elaídico= ELA, oleico= OLE, linoléico= LINO y linolénico= LINOLEN) y del dodecil sulfato (DDS) sódico en medio básico, con el óxido mixto procedente de una hidrotalcita ( $\text{HT-CO}_3$ , Mg/Al 3:1) calcinada ( $\text{HT}_{500}$ ), permite obtener complejos de estructura laminar (HT-ácidos grasos o HT-DDS) u organohidrotalcitas. Estos complejos resultan con distinta anchura y densidad de interlámina orgánica, cuyas posibles estructuras se proponen a partir de los datos de caracterización. La presencia de uno o varios enlaces en configuración *cis* en la cadena hidrocarbonada del ácido graso determina su disposición en la interlámina, la anchura de ésta, así como la estabilidad de la organohidrotalcita resultante. Una parte del anión de ácido graso o DDS se asocia a la superficie externa y esta parte es menor en los



ácidos con dobles enlaces en configuración cis, confiriendo distinto valor de potencial Z a las correspondientes partículas.

5. Los complejos HT-ácidos grasos mejoran, al igual que el HT-DDS, la adsorción de casi todos los pesticidas en el material de partida, la HT-calcinada utilizada para su preparación, a excepción de los herbicidas ácidos (clopiralida e imazetapir). Los complejos HT-ácidos grasos o HT-DDS adsorben los plaguicidas básicos (atrazina y terbutilazina) y polares (alacoloro, diuron y metalaxil) por una combinación de fuerzas polares e hidrofóbicas, principalmente asociados a la interlámina orgánica, pero también a la superficie externa: a) El plaguicida que presenta mayor adsorción en el caso de los pesticidas débilmente básicos es el de menor solubilidad (terbutilazina) y en los polares los de solubilidad media-alta (alacoloro y metalaxil) y b) Los mejores adsorbentes son el HT-DDS seguido del HT-ELA, a pesar de la diferente dimensión de la interlámina, 2.5 y 4.0 nm respectivamente, y el diferente empaquetamiento.
6. El estudio más detallado del metalaxil y su comportamiento enantiomérico permite sugerir la posibilidad del empleo de estos complejos como enmendantes de suelo para aumentar su retención y disminuir sus pérdidas por lixiviación e igualmente como portadores para disminuir las pérdidas por lavado hacia las aguas subterráneas. En este caso particular del metalaxil, disminuiría la acumulación del enantiomero S que no es eficaz en el control de las enfermedades, pero sí se acumula en los suelos y pasa en mayor cantidad a las aguas.

- **Sistemas arcillas-materia orgánica soluble (MOS):**

7. La adsorción de MOS aumentó el espaciado interlaminar en las arcillas catiónicas, debido a la intercalación de compuestos polares, tal y como sugieren los resultados de diversas espectroscopias (UV-VIS, Fluorescencia e IR). La adsorción de MOS en las arcillas aniónicas ocurrió principalmente en la superficie externa, ya que la alta carga laminar y afinidad de los iones carbonato en la interacción lámina-anión-lamina impide el acceso al espacio interlaminar de estas arcillas. En este caso se adsorben mayor diversidad de compuestos presentes en la MOS, incluidos los coloreados. Las arcillas aniónicas presentaron mayor afinidad y adsorción frente a la MOS que las arcillas catiónicas.
8. Las arcillas originales presentaron una baja capacidad como adsorbentes de los distintos contaminantes estudiados, algo mayor para los más hidrófobos y protonables (dibenzofurano, terbutilazina y terbutrina), en la arcilla catiónica debido a su propia superficie

interna hidrófoba. Los complejos arcilla-MOS presentaron un ligero aumento de la adsorción en la mayoría de los casos, pero también más destacable para los compuestos más hidrófobos (dibenzofurano y terbutrina) en el caso de la arcilla catiónica por el mayor carácter hidrófobo de la MOS asociada a la interlámina que hace este espacio más accesible. El gran aumento de la adsorción de terbutrina en SWy2-MOS podría deberse a que al efecto anterior se suma la protonación y adsorción interlaminar de este herbicida.

9. Las arcillas empleadas como posibles enmendantes de suelo mejoran la adsorción tanto de terbutrina como de dibenzofurano y esta mejora aumenta con la adición de MOS al suelo enmendado. Los compuestos altamente hidrofóbicos y/o protonables podrían ser los más propensos a adsorberse a los complejos, con lo que verían reducida su movilidad en el suelo en presencia de altas concentraciones de MOS tras la adición de las arcillas, o en un suelo con alta proporción de arcilla esmectítica por la adición de un residuo orgánico con alto contenido en MOS.

Resumiendo, los resultados obtenidos e interpretados en esta Tesis permiten afirmar que compuestos orgánicos naturales como el quitosano, los ácidos grasos o la materia orgánica soluble procedente de un residuo agroalimentario (alperujo) pueden usarse para obtener complejos con arcillas catiónicas o aniónicas, que resultan ser buenos adsorbentes de plaguicidas u otros contaminantes orgánicos. Por tanto, pueden ser empleados para eliminar estos compuestos de las aguas o para disminuir su movilidad en el suelo hacia aguas subterráneas, bien como enmendantes o posibles barreras en suelos, bien actuando de portadores en formulaciones de liberación controlada o lenta. Se vuelve a comprobar que el alcance o rango de esta aplicación depende del tipo de adsorbente, de las características del plaguicida o contaminante y del tipo de suelo del que se trate, resultando difícil hacer un diseño o estrategia genérica.



From the final considerations obtained previously in the chapters dealing with various organo-clay systems, the following conclusions can be drawn:

- **Montmorillonite-chitosan systems:**

1. The biopolymer chitosan intercalates in the interlayer space of montmorillonite and also associates with its external surface, leading to an increase in adsorption capacity of different pesticides with respect to the unmodified clay.

2. The increase in adsorption due to the association of the biopolymer with the clay depended to a great extent on the pH of the medium and the type of pesticide because the interaction of pesticides with the complex is a combination in different proportions of ionic, polar and hydrophobic forces, depending on the considered pesticide. The largest increases in adsorption are observed: a) at neutral pH for the acidic, basic and polar pesticides of medium or low water solubility (imazethapyr, terbutylazine and metalaxyl) and b) at acid pH for acidic and high water solubility pesticides (clopyralid and imazethapyr).

3. The montmorillonite-chitosan complexes exhibit good adsorption of clopyralid in acid aqueous medium, and act as amendments on acid soils increasing the retention of this herbicide. The complexes are also effective as carriers in herbicide formulations to decrease the leaching losses of the herbicide, especially under high-risk of heavy rain and in acid soils. Their efficacy as adsorbents decreases in neutral soils.

- **Hydrotalcite-unsaturated fatty acids systems:**

4. The interaction of unsaturated fatty acid anions (elaidic= ELA, oleic= OLE, linoleic= LINO and linolenic= LINOLEN) and dodecyl sulfate (DDS) with Mg/Al mixed oxide (HT<sub>500</sub>), obtained by calcination of the anionic clay HT-CO<sub>3</sub>, renders inorganic-organic complexes with layered structure or organohydrotalcites. These complexes (HT-fatty acids or HT-DDS) have organic interlayers with different width and density and whose possible structures are proposed from the characterization data. The presence of one or more double bonds in *cis* configuration in the hydrocarbon chain of the fatty acid determines its arrangement in the interlayer, the gallery height, as well as the stability of the resulting organohydrotalcite.

5. HT-fatty acids and HT-DDS complexes had greater adsorption capacity for most pesticides than the starting materials (HT-CO<sub>3</sub> or HT<sub>500</sub>), except for the acid herbicides (clopyralid and imazethapyr) which were largely adsorbed on HT<sub>500</sub>. The HT-fatty acids or HT-DDS complexes adsorb basic (atrazine and terbutylazine) and polar (alachlor, diuron and metalaxyl) pesticides through a combination of polar and hydrophobic interactions, mainly

involving the organic interlayer: a) The higher adsorption is observed for the weakly basic pesticides with low water solubility (terbutylazine) and for the polar pesticides with medium water solubility (alachlor and metalaxyl) and b) the best adsorbents are HT-DDS followed by HT-ELA, despite the different dimension of the interlayer, 2.5 and 4.0 nm respectively, and different way of packing.

6. The study of metalaxyl soil behavior allows us to suggest the possible use of these organohydrotalcites as amendments to increase the soil retention capacity and as carriers in formulations, both to reduce the fungicide leaching losses to ground water. Enantiomeric analysis of the metalaxyl behavior in soil suggests that the use of fungicide-organohydrotalcite formulations allows decreasing the accumulation of the S enantiomer after successive soil application. This fact is very relevant since the S-enantiomer is not effective in the control of diseases and accumulates in environmental compartments. The use of metalaxyl-organohydrotalcite formulations could help reduce the risk of water contamination.

- **Clay-soluble organic matter (SOM) system**

7. The SOM adsorption on cationic clays increased the interlayer distance indicating the intercalation of polar molecules of low aromaticity, as suggested by spectroscopy (UV-VIS, Fluorescence and IR) results. These SOM molecules bind to hydration water molecules and the interlayer hydrophobic smectite surfaces. The colored compounds are negligibly adsorbed on the cationic clays. The SOM adsorption on anionic clays occurred mainly on the outer surface, since the high layer charge and the very high affinity of carbonate for the Mg/Al layer strongly limit the accessibility to the interlayer space. The anionic clays adsorbed almost all the diversity of organic molecules in the SOM, including colored compounds. The adsorbent power for SOM was much higher for anionic clays than for cationic ones.

8. The original clays showed a low sorption capacity for the diverse organic contaminants studied; this adsorption was more significant for highly hydrophobic and protonable compounds (dibenzofuran y terbutrine) mostly in SWy-2 due to the hydrophobic regions in its surface. The clay-SOM complexes showed a slightly higher sorption of the organic contaminants, more relevant for the most hydrophobic compounds (dibenzofuran and terbutrine), especially for SWy-2 due to the presence of SOM in the interlayer; the SOM makes this space more hydrophobic and accessible to those molecules. The great increase in terbutrine adsorption on SWy-2-SOM system could be due to protonation of part of the terbutrine adsorbed in the interlayer, which adds to the fraction hydrophobically adsorbed.

9. The cationic and anionic clays used as soil amendments improve the soil adsorption of the most hydrophobic compounds (terbutrine and dibenzofuran), particularly in the presence of SOM. This increased adsorption would reduce the contaminant mobility in soil. It can be expected that contaminant immobilization could also occur in soils with high smectite contents by the addition of an organic residue with a high content in SOM.

In summary, the results obtained and interpreted in this Thesis support the conclusion that natural organic compounds such as chitosan, fatty acids or the soluble organic matter from an agro-food waste (alperujo) allow to obtain complexes with cationic or anionic clays that are good adsorbents of pesticides and other organic contaminants. Such complexes can be used to remove these compounds from water and/or to reduce their mobility in soil and thereby the risk of ground water contamination. The latter application can be achieved either by their use as soil amendments or barriers in soil or as carriers in controlled/slow release formulations. It is shown, one more time, that the scope or range of this application depends on the type of adsorbent, the characteristics of the pesticide or contaminant and the soil type, so that it is difficult to make a generic design or strategy.





## VII. Bibliografía





## Bibliografía

Abdelhafid R., Houot S., Barriuso E. 2000. Dependence of atrazine degradation on C and N availability in adapted and non-adapted soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 32, 3, 389-401.

Addorisio V., Esposito S., Sannino F. 2010. Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 5011-5016.

Aguer J.P., Hermosin M.C., Calderon M.J; Cornejo J. 2000. Fenuron sorption on homoionic natural and modified smectites. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes B*. 35, 3, 279-296.

Aguzzi C., Capra P., Bonferoni C., Cerezo P., Salcedo I., Sanchez R., Caramella C., Viseras C. 2010. Chitosan-silicate biocomposites to be used in modified drug release of 5-aminosalicylic acid (5-ASA). *Applied Clay Science*. 50, 106-111.

Ainsworth C.C., Zachara J.M., Smith S.C. 1989. Carbazole sorption by surface and subsurface materials: influence of sorbent and solvent properties. *Soil Science Society of America Journal*. 53, 1391-1401.

Albaladejo J., Stocking M., Diaz E., Castillo V. 1994. Land rehabilitation by urban refuse amendments in a semi-arid environment: effect on soil chemical properties. *Soil Technology*. 7, 249-260.

Albarrán A., Celis R., Hermosín M.C., López-Piñeiro A., Ortega-Calvo J.J., Cornejo J. 2003. Effects of solid olive-mill waste addition to soil on sorption, degradation and leaching of the herbicide simazine. *Soil Use and Management*. 19, 150-156.

Albarrán A., Celis R., Hermosín M.C., López-Piñeiro A., Cornejo J. 2004. Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere*. 54, 717-724.

Alburquerque J.A., González J., García D., Cegarra J. 2004. Agrochemical characterization of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*. 91, 195-200.

Alburquerque J.A., González J., García D., Cegarra J. 2006. Measuring detoxification and maturity in compost made from "alperujo", the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere*. 64, 470-477.

- Alburquerque J.A., González J., Tortosa G., Baddi G.A., Cegarra J. 2009. Evaluation of "alperujo" composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation*. 20, 257-270.
- Alcántara A.C.S., Aranda P., Darder M., Ruiz-Hitzky E. 2010. Bionanocomposites based on alginate-zein/layered double hydroxide materials as drug delivery systems. *Journal of Materials Chemistry*. 20, 9495-9504.
- Alekseeva T., Prevot V., Sancelme M., Forano C., Besse-Hoggan P. 2011. Enhancing atrazine biodegradation by *Pseudomonas* sp. strain ADP adsorption to Layered Double Hydroxide bionanocomposites. *Journal of Hazardous Materials*. 191, 1-3, 126-135.
- Allen R. y Walker A. 1987. The Influence of Soil Properties on the Rates of Degradation of Metamitron, Metazachlor and Metribuzin. *Pesticide Science*. 18, 2, 95-111.
- Alvey S. y Crowley D.E. 1995. Influence of organic amendments on biodegradation of atrazine as a nitrogen source. *Journal of Environmental Quality*. 24, 1156-1162.
- An J.H. y Dultz S. 2007a. Polycation adsorption on montmorillonite: pH and T as decisive factors for the kinetics and mode of chitosan adsorption. *Clay Minerals*. 42, 329-339.
- An J.H. y Dultz S. 2007b. Adsorption of tannic acid on chitosan-montmorillonite as a function of pH and surface charge properties. *Applied Clay Science*. 36, 356-264.
- Annabi M., Houot S., Francou C., Poitrenaud M., Le Bissonnais Y. 2007. Soil aggregate stability improvement with urban composts of different maturities. *Soil Science Society of America Journal*. 71, 2, 413-423.
- Aragón R., García J.L., Morell I., Hernández F., Turón J., Pozo O., Grimalt S. 2001. Investigación de las aguas subterráneas de la Vega mediana del Segura (Murcia). *Hidrología y Recursos hidráulicos*. 24, 363-377.
- Araki D., Takase I., y Motoyama N. 2003. Leaching of pesticides applied to an experimental putting green and their fate in a reservoir. *Journal of Pesticide Sciences*. 28, 1, 76-82.
- Aranda E. 2006. Fraccionamiento físico del alperujo como base para desarrollar una estrategia biológica con hongos saprobios que arbusculares para la eliminación de su fototoxicidad. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

- Arias-Estévez M., López-Periago E., Martínez-Carballo E., Simal-Gandara J., Mejuto J.C., García-Río L. 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 123, 247-260.
- Arora K., Mickelson S.K., Helmers M.J., Baker J.L. 2010. Review of Pesticides retention process occurring in buffer strips receiving agricultural runoff. *Journal of the American Water Resources Association*. 46, 618-647.
- Ayala-Luis K.B., Koch C.B., Hansen H.C.B. 2010. Intercalation of linear C9-C16 carboxylates in layered FeII-FeIII-hydroxides (green rust) via ion Exchange. *Applied Clay Science*. 48, 334-341.
- Aylmore L.A.G, Sills I.D. y Quirk J.P. 1970. Surface area of homoionic illite and montmorillonite clay minerals as measured by the sorption of nitrogen and carbon dioxide. *Clays and Clay Minerals*. 18, 91-96.
- Azam F., Fuhr F., Mittelstaedt W. 1988. Fate of [Carbonyl-C-14]Methabenzthiazuron in An Arid Region Soil - Effect of Organic Amendment, Soil Disturbance and Fumigation. *Plant and Soil*. 107, 149-158.
- Badalucco L., Rao M., Colombo C., Palumbo G., Laudicina V.A., Gianfreda L. 2010. Reversing agriculture from intensive to sustainable improves soil quality in a semiarid South Italian soil. *Biology and Fertility of Soils*. 46, 481-489.
- Baddi G.A., Albuquerque J.A., González J., Cegarra Juan, Hafidi M. 2004. Chemical and spectroscopic analyses of organic matter transformations during composting of olive mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 54, 39-44.
- Bailey G.W., White J.L., Rothberg T. 1968. Adsorption of organic herbicides by montmorillonite: role of pH and chemical character of adsorbate. *Soil Science Society of America Proceedings*. 32, 222-234.
- Bailey G.W. y White J.L. 1970. Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil. *Residue Reviews*. 32, 29-92.
- Barriga C., Gaitán M., Pavlovic I., Ulibarri M. A., Hermosín M. C., Cornejo J. 2002. Hydrotalcites as sorbent for 2,4,6-trinitrophenol: influence of the layer composition and interlayer anion. *Journal of Materials Chemistry*. 12, 1027-1034.
- Barrer R. M. 1989. Shape-selective sorbents based on clay minerals: a Review. *Clays and Clay Minerals*. 37, 5, 385-395.

- Barriuso E. y Koskinen W. C. 1996. Incorporating nonextractable atrazine residues into soil size fractions as a function of time. *Soil Science Society of America Journal*. 60, 1, 150-157.
- Barriuso E., Houot S., Serra-Wittling C. 1997. Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pesticide of Science*. 1997, 49, 65-75.
- Barriuso E., Andrades M.S., Benoit P., Houot S. 2011. Pesticide desorption from soils facilitated by dissolved organic matter coming from composts: experimental data and modeling approach. *Biogeochemistry*. 106, 117-133.
- Bastida F., Moreno J.L., García C., Hernández T. 2007. Addition of urban waste to semiarid degraded soil: long-term effect. *Pedosphere*. 17, 557-567.
- Bautista-Baños S., Hernández-Lauzardo A.N., Velázquez-del Valle M.G., Hernández-López M., Ait Barka E., Bosquez-Molina E., Wilson C.L. 2005. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*. 25, 108-118.
- Beigel C. Charnay M.P., Barriuso E. 1999. Degradation of formulated triticonazole fungicide in soil: effect of application rate. *Soil Biology and Biochemistry*. 31, 525-534.
- Bejarano M. y Madrid L. 1992. Solubilization of heavy-metals from a river sediment by a residue from olive oil industry. *Environmental Technology*. 13, 10, 979-985.
- Belaïd C., Kallel M., Khadhraou M., Lalleve G., Elleuch B., Fauvarque J.F. 2006. Electrochemical treatment of olive mill wastewaters: Removal of phenolic compounds and decolourization. *Journal of Applied Electrochemistry*. 36, 10, 1175-1182.
- Bellamy L.J. 1975. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, vol. I, 3rd ed., Chapman and Hall, London.
- Benhamou N., Lafontaine P. J., Nicole M. 1994. Induction of systemic resistance to fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*. 84, 1432-1444.
- Besse-Hoggan P., Alekseeva T., Sancelme M., Delort A.M., Forano C. 2009. Atrazine biodegradation modulated by clays and clay/humic acid complexes. *Environmental Pollution*. 157, 10, 2837-2844.
- Bin Hussein M. Z., Yahaya A. H., Zainal Z., Kian L. H. 2005. Nanocompositebased controlled release formulation of an herbicide, 2,4-

dichlorophenoxyacetate encapsulated in zinc-aluminium-layered double hydroxide. *Science and Technology of Advanced Materials*. 6, 8, 956-962.

Bin Hussein M. Z., Hashim N., Yahaya A. H., Zainal Z. 2009. Controlled Release Formulation of Agrochemical Pesticide Based on 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyrate Nanohybrid. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 9, 3, 2140-2147.

Bleiman N. y Mishael Y.G. 2010. Selenium removal from drinking water by adsorption to chitosan-clay composites and oxides: batch and column tests. *Journal Hazardous Materials*. 183, 590-595.

Boddu V.M., Abburi K., Talbott J.L., Smith E.D., Haasch R. 2008. Removal of arsenic (III) and arsenic (V) from aqueous medium using chitosan-coated biosorbent. *Water Research*. 42, 633-642.

Bogolte B.T, Ehlers G.A.C., Braun R., Loibner A.P. 2007. Estimation of PAH bioavailability to *Lepidium sativum* using sequential supercritical fluid extraction – a case study with industrial contaminated soils. *European Journal of Soil Biology*. 43, 4, 242-250.

Bollag J. M. y Myers C. 1992. Detoxification of Aquatic and Terrestrial Sites Through Binding of Pollutants to Humic Substances. *Science of the Total Environment*. 118, 357-366.

Bordjiba O., Steiman R., Kadri M., Semadi A., Guiraud P. 2001. Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*. 30, 418-426.

Borja M. y Dutta P. K. 1992. Fatty acids in layered metal hydroxides: membrane-like structure and dynamics. *Journal of Physical Chemistry*. 96, 5434-5444.

Bouraada M., Belhalfaoui F., Ouali M.S., de Menorval L.C. 2009. Sorption study of an acid dye from an aqueous solution on modified Mg-Al layered double hydroxides. *Journal of Hazardous Materials*. 163, 463-467.

Boyd S.A., Shaobai S., Lee J.F., Mortland M.M. 1988. Pentachlorophenol sorption by organo-clays, *Clays and Clay Minerals*. 36, 125-130.

Brindley G. W. y Kikkawa S. 1980. Thermal-Behavior of Hydrotalcite and of Anion-Exchanged Forms of Hydrotalcite. *Clays and Clay Minerals*. 28, 2, 87-91.

Brouwer D.H., Brouwer E.J., Vanhemmen J.J. 1994. Estimation of long term exposure to pesticides. *American Journal of Industrial Medicine*. 25, 4, 573-588.

- Bruna F., Pavlovic I., Barriga C., Cornejo J., Ulibarri M.A. 2006. Adsorption of pesticides Carbetamide and Metamitron on organohydrotalcite. *Applied Clay Science*. 33, 116–124.
- Bruna F., Pavlovic I., Celis R., Barriga C., Cornejo J., Ulibarri M.A. 2008. Organohydrotalcites as novel supports for the slow release of the herbicide terbuthylazine. *Applied Clay Science*. 42, 194–200.
- Bruna F., Celis R., Pavlovic I., Barriga C., Cornejo J., Ulibarri M.A. 2009. Layered double hydroxides as adsorbents and carriers of the herbicide (4-chloro-2-methylphenoxy) acetic acid (MCPA): systems Mg–Al, Mg–Fe and Mg–Al–Fe. *Journal of Hazardous Materials*. 168, 1476–1481.
- Bruna González Felipe. 2010. Aplicación de hidrotalcitas como adsorbentes para la reducción de la contaminación por plaguicidas de aguas y suelos. Tesis Doctoral.
- Bruna F., Celis R., Real M., Cornejo J. 2012. Organo/LDH nanocomposite as an adsorbent of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and soil–water systems. *Journal of Hazardous Materials*. 225– 226, 74– 80.
- Brunauer S., Emmett P.H., Teller E. 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*. 60, 309–319.
- Buendía I.M. 2008. Biotratibilidad anaerobia de aguas y residuos industriales. Universidad de Castilla-La Mancha. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Ingeniería Química. Tesis Doctoral.
- Buerge I.J., Poiger T., Muller M.D., Buser HR. 2003. Enantioselective degradation of metalaxyl in soils: Chiral preference changes with soil pH. *Environmental Science and Technology*. 37, 2668–2674.
- Buser H.R., Muller M.D., Poiger T., Balmer M.E. 2002. Environmental behavior of the chiral acetamide pesticide metalaxyl: Enantioselective degradation and chiral stability in soil. *Environmental Science and Technology*. 36, 2, 221–226.
- Cabrera F. 1995. El alpechín: un problema mediterráneo. Geoforma Ediciones. La calidad de las aguas continentales españolas. Estado actual e investigación: Spanish inland water quality. Current State and Research. 141–154.
- Cabrera A., Cox L., Koskinen W.C., Sadowsky M.J. 2008. Availability of triazine herbicides in aged soils amended with olive oil mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 11, 4112–4119.

- Cabrera D., López-Piñeiro A., Albarrán A., Peña D. 2010. Direct and residual effects on diuron behaviour and persistent following two-phase olive mil waste addition to soil: field and laboratory experiments. *Geoderma*. 157, 133-141.
- Cañero A.I., Becerra D., Cornejo J. Hermosín M.C., Albarrán A., López-Piñeiro A., Cox L. 2012. Transformation of organic wastes in soil: Effect on bentazone behaviour. *Science of the Total Environment*. 433, 198-205.
- Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M.A., Cristinzio G. 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*. 79, 4, 393-398.
- Capel P.D. y Larson S.J. 2001. Effect of scale on the behavior of atrazine in surface waters. *Environmental Science and Technology*. 35, 4, 648-657.
- Cardoso L.P., Tronto J., Crepaldi E.L., Valim J.B. 2003. Removal of benzoate anions from aqueous solution using Mg-Al layered double hydroxides. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 390, 49-56.
- Cardoso L. y Valim J.B. 2006. Study of acids herbicides removal by calcined Mg-Al-CO<sub>3</sub>-LDH. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 67, 987-993.
- Cardoso L.P., Celis R., Cornejo J., Valim J.B. Layered Double Hydroxides as Supports for the Slow Release of Acid Herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 5968-5975.
- Carlson R. 1962. Houghton Mifflin, New York.
- Carrizosa M.J., Calderón M.J., Hermosín M.C., Cornejo J., 2000. Organosmectite as sorbent and carrier of the herbicide bentazone. *Science of Total Environment*. 247, 285-293.
- Carrizosa M.J., Hermosín M.C., Koskinen W.C., Cornejo J. 2003. Use of organosmectites to reduce leaching losses of acidic herbicides. *Soil Science Society of America Journal*. 67, 2, 511-517.
- Casanovas J. 1996. Dioxinas y furanos. Problemática ambiental y metodología analítica. España, Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente.
- Cavani F., Tirifò F., Vaccari A. 1991. Hydrotalcite-type anionic clays preparation, properties and applications. *Catalysis Today*. 11, 173-301.
- Cecchi A. M., Koskinen W. C., Cheng H. H., Haider K. 2004. Sorption-desorption of phenolic acids as affected by soil properties. *Biology and Fertility of Soils*. 39, 4, 235-242.



Celis R. 1996. Modelos de asociación Arcilla-Óxido-Materia orgánica del suelo en relación con la adsorción de compuestos orgánicos.

Celis R., Cox L., Hermosín M.C., Cornejo J. 1997a. Sorption of thiazafuron by iron- and humic acid-coated montmorillonite. *Journal of Environmental Quality*. 26, 472-479.

Celis R., Cornejo J., Hermosín M. C., Koskinen W. C. 1997b. Sorption-desorption of atrazine and simazine by model soil colloidal components. *Soil Science Society of America Journal*. 61, 2, 436-443.

Celis R., Barriuso E., Houot S. 1998a. Sorption and desorption of atrazine by sludge-amended soil: Dissolved organic matter effects. *Journal of Environmental Quality*. 27, 6, 1348-1356.

Celis R., Cornejo J., Hermosín M.C., Koskinen W.C. 1998b. Sorption of atrazine and simazine by model associations of soil colloids. *Soil Science Society of America Journal*. 62, 1, 165-171.

Celis R., Hermosín M.C., Cox L., Cornejo J. 1999a. Sorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by model particles simulating naturally occurring soil colloids. *Environmental Science and Technology*. 33, 1200-1206.

Celis R., Koskinen W.C., Cecchi A.M., Bresnahan G.A., Carrisoza M.J., Ulibarri M.A., Pavlovic I., Hermosín M.C. 1999b. Sorption of the ionizable pesticide imazamox by organo-clays and organohydrotalcites. *Journal Environmental Science and Health Part B*. 34, 929-941.

Celis R. y Koskinen W.C. 1999. An isotopic exchange method for the characterization of the irreversibility of pesticide sorption-desorption in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 2, 782-790.

Celis R., Koskinen W.C., Hermosín M.C., Ulibarri M.A., Cornejo J. 2000. Triadimefon interactions with organoclays and organohydrotalcites. *Soil Science Society of America Journal*. 64, 36-43.

Celis R., Hermosín M.C., Carrizosa M.J., Cornejo J. 2002a. Inorganic and organic clays as carriers for controlled release of the herbicide hexazinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 8, 2324-2330.

Celis R., Hermosín M., Cornejo L., Carrizosa M., Cornejo J. 2002b. Clayherbicide complexes to retard picloram leaching in soil. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 82, 8-9, 503-517.

- Celis R., Trigo C., Facenda G., Hermosin M., Cornejo J. 2007. Selective modification of clay minerals for the adsorption of herbicides widely used in olive groves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 6650-6658.
- Celis R., Adelino M.A., Hermosín M.C., Cornejo J. 2012. Montmorillonite-chitosan bionanocomposites as adsorbents of the herbicide clopyralid in aqueous solution and soil/water suspensions. *Journal of Hazardous Materials*. 209-210, 67-76.
- Celis R., Gámiz B., Adelino M.A., Hermosín M.C., Cornejo J. 2013. Environmental behavior of the enantiomers of the chiral fungicide metalaxyl in Mediterranean agricultural soils. *Science of The Total Environment*. 444, 288-297
- Cerezo P., Viseras C., Aguzzi C., Cerezo A. 2003. Aproximación al estudio de complejos maleato de timolol-sepiolita para su uso en farmacia. In VI Congreso de la Sociedad española de Farmacia Industrial y Galénica, Granada.
- Chaara D., Pavlovic I., Bruna F., Ulibarri M.A., Draoui K., Barriga C. 2010. Removal of nitrophenol pesticides from aqueous solutions by layered double hydroxides and their calcined products. *Applied Clay Science*. 50, 3, 292-298.
- Chaara D., Bruna F., Ulibarri M.A., Draoui K., Barriga C., Pavlovic I. 2011. Organo/layered double hydroxide nanohybrids used to remove non ionic pesticides. *Journal of Hazardous Materials*. 196, 350-359.
- Chen H., Wang J. M., Pan T., Xiao H. M., Zhang J. Q., y Cao C. N. 2002. Effects of coprecipitated zinc on the structure and electrochemical performance of Ni/Allayered double hydroxide. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27, 5, 489-496.
- Chen S. y Liu W. 2009. Enantioselective degradation of metalaxyl in anaerobic activated sewage sludge. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 82, 327-31.
- Cheng H.H. y Lehmann R.G. 1985. *Weed Science*. 33, 2, 7-10.
- Cheng H.H. 1990. *Pesticide in Soil Environment*. SSSA Book Series 2, Wisconsin, 530.
- Chibwe K. y Jones W. 1989. Intercalation of organic and inorganic anions into layered double hydroxides. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*. 14, 926-927
- Chin Y.P., Aiken G., Oloughlin E. 1994. Molecular-weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology*. 28, 11, 1853-1858.

Chiou C.T., Peters L.J., Freed V.H. 1979. A physical concept of soil-water equilibria for nonionic organic compounds. *Science*. 206, 4420, 831-832.

Choy Jin-Ho, Choi Soo-Jin, Oh Jae-Min, Park Taeun. 2007. Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications. *Applied Clay Science*. 36, 122-132.

Clearfield A., Kieke M., Kwan J., Colon J.L., Wang R.C. 1991. Intercalation of dodecyl sulfate into layered double hydroxides. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*. 11, 361-378.

Corma A., Fornés V., Rey F. 1994. Hydrotalcites as base catalysts: Influence of the chemical composition and Synthesis conditions on the dehydrogenation of isopropanol. *Journal of Catalysis*. 148, 205-212.

Cornejo J., Hermosín M.C., White J.L., Barnes J.R., Hem S.L. 1983. Role of ferric iron in the oxidation of hydrocortisone by sepiolite and palygorskite. *Clays and Clay Minerals*. 31, 2, 109-112.

Cornejo J. y Hermosin MC. 1996. Interaction of Humic Substances and Soil Clays. En *Humic Substances in Terrestrial Ecosystem*, A. Piccolo (ed.), Elsevier Sci. Publ. Amsterdam. 595-694.

Cornejo J., Celis R., Pavlovic I., Ulibarri M.A., Hermosín M.C. 2000. Structural changes in phenol-intercalated hydrotalcite caused by heating. *Clay Mineralals*. 35, 5, 771-779.

Cornejo J., Celis R., Cox L., Hermosín M.C. 2004. Pesticide-Clay interaction and Formulations. En *Clay Surfaces: Fundamentals and Applications* (Wypich E.y Satyanarayana KG, eds) Interface Science and Technology, Elsevier Academic Press Amsterdam. 245-266.

Cornejo J., Hermosín MC., Celis R., Cox L. 2005. Methods to determine sorption of pesticides and other organic compounds. En *Soil-Water-Solute process characterization*, J Alvarez-Benedí and R Muñoz-Carpena, eds.) CRC Press, Boca ratón. 435-463.

Cornejo J., Celis R., Pavlovic I., Ulibarri M.A. 2007. Interactions of pesticides with clays and layered double hydroxides: a review. *Clay Minerals*. 43, 155-175.

Cornejo J., Celis R., Pavlovic I., Ulibarri M.A. 2008. Interactions of pesticides with clays and layered double hydroxides: a review. *Clay Minerals*. 43, 155-175.

Cortinas C. 2003. Actividades de Preparación del Plan Nacional de Implementación (PNI) de la Convención de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) y de los Planes de Acción Nacional sobre Lindano,

Dioxinas, Furanos y Hexaclorobenceno: El hexaclorobenceno en perspectiva. Dirección de Investigación sobre Sustancias Químicas y Riesgos Ecotoxicológicos. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT. México.

Costa F.R., Leuteritz A., Wagenknecht, Jehnichen D., Häußler L., Heinrich G. 2008. Intercalation of Mg-Al layered double hydroxide by anionic surfactants: preparation and characterization. *Applied Clay Science*. 38, 153-164.

Cox L., Hermosín M. C., Cornejo J. 1995. Adsorption Mechanisms of Thiazafluron in Mineral Soil Clay Components. *European Journal of Soil Science*. 46, 3, 431-438.

Cox L., Walker A., Welch S.I. 1996. Evidence for the accelerated degradation of isoproturon in soils. *Pesticide Science*. 48, 253-260.

Cox L., Hermosin M.C., Celis R., Cornejo J. 1997a. Sorption of two polar herbicides in soils and soil clays suspensions. *Water Research*. 31, 1309-1316.

Cox L., Celis R., Hermosín M. C., Becker A., Cornejo J. 1997b. Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 65, 2, 151-161.

Cox L., Hermosín M. C., Cornejo J. 1999a. Leaching of simazine in organicamended soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 30, 11-12, 1697-1706.

Cox L., Calderón M.J., Hermosín M.C., Cornejo J. 1999b. Leaching of clopyralid and metamitron under conventional and reduced tillage systems. *Journal of Environmental Quality*. 28, 2, 605-610.

Cox L., Celis R., Hermosín M.C., Cornejo J. 2000a. Natural soil colloids to retard simazine and 2,4-D leaching in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 1, 93-99.

Cox L., Celis R., Hermosin M.C., Cornejo J., Zsolnay A., Zeller K. 2000b. Effect of organic amendments on herbicide sorption as related to the nature of the dissolved organic matter. *Environmental science and technology*. 34, 21, 4600-4605.

Cox L., Cecchi A., Celis R., Hermosín M.C., Koskinen W.C., Cornejo J. 2001. Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils. *Soil Science Society of America Journal*. 65, 1688-1695.

Cox L., Koskinen W.C., Hermosín M.C., Cornejo J., Arthur E.L. 2002. Sorption of two new sulfonylaminocarbonyltriazolinone herbicides and their metabolites on

organic and inorganic exchanged smectites. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 82, 8-9.

Cox L., Fernandes M.C., Zsolnay A., Hermosín M.C., Conerjo J. 2004. Changes in dissolved organic carbón of soil amendments with aging: effect on pesticide adsorption behavior. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 18, 5635-5642.

Crepaldi E.L., Tronto J., Cardoso L.P., Valim J.B. 2002. Sorption of terephthalate anions by calcined and uncalcined hydrotalcite-like compounds. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*. 211, 2-3, 103-114.

Cruz Guzmán M, Celis R., Hermosín M.C., Leone P., Nègre M., Cornejo J. 2003. Sorption-Desorption of lead (II) and Mercury (II) by model associations of soil Colloids. *Soil Science Society of America Journal*. 67, 1378-1387

Cruz-Guzman M., Celis R., Hermosin M.C., Koskinen W.C., Cornejo J. 2005. Adsorption of pesticides from water by functionalized organobentonites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 7502-7511.

Cuadros J. 1997. Interlayer cation effects on the hydration state of smectite. *American Journal of Science*. 297, 8, 829-841.

Dabrowski J.M., Peall S.K.C., Van Niekerk A., Reinecke A.J., Day J.A., Schulz R. 2002. Predicting runoff-induced pesticide input in agricultural sub-catchment surface waters: linking catchment variables and contamination. *Water Research*. 36, 20, 4975-4984.

Darder M., Colilla M., Ruiz-Hitzky E., 2003. Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonita. *Chemistry of Materials*. 15, 3774-3780.

Darder M., Colilla M., Ruiz-Hitzky E. 2005. Chitosan-clay nanocomposites: application as electrochemical sensors. *Applied Clay Science*. 28, 199-208.

Davidtz J.C. y Summer M.E. 1965. Blocked charges on clay minerals in subtropical soils. *European Journal of Soil Science*. 16, 270-274.

Davison E.M. y McKay A.G. 1999. Reduced persistence of metalaxil in soil associated with its failure to control cavity spot of carrots. *Plant Pathology*. 48, 830-835.

De Martino A., Arienzo M., Iorio M., Vinale F., Lorito M., Prenzler P.D., Ryan D., Obied H.K. 2011. Detoxification of olive mil wastewater by Zinc-aluminium layered doublé hydroxides. *Applied Clay Science*. 53, 737-744.

Del Hoyo C. 2007. Layered double hydroxides and human health: An overview. *Applied Clay Science*. 36, 1-3, 103-121.

Dixon J.B. y Weed S.B. 1989. *Minerals in Soils Environments*. 2nd Ed. SSSA, Madison, 1244.

Donato R.K., Luza L., da Silva R.F., Moro C.C., Guzzatto R., Samios D., Mateja L., Dimzoski B., Amico S.C., Schrekker H.S. 2012. The role of oleate-functionalized layered double hydroxide in the melt compounding of polypropylene nanocomposites. *Materials Science and Engineering: C*. 32, 2396-2403.

El-Nahhal Y., Nir S., Polubesova T., Margulies L., Rubin B. 1998. Leaching, phytotoxicity, and weed control of new formulations of alachlor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 8, 3305-3313.

Enserink M., Hines, P.J., Vignieri S.N., Wigginton S.N., Yeston J.S. 2013. The Pesticide Paradox. *Science*. 341, 728-729

EPA US Environmental Protection Agency EPI v3.10 software. <http://www.epa.gov/opptintr/exposure/docs/episuite.htm>.

Ezzaim A., Turpault M.P., Ranger J. 1999. Quantification of weathering processes in an acid brown soil developed from tuff (Beaujolais, France). Part II. Soil formation. *Geoderma*. 87, 155-177.

FAO, 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Agricultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. Roma.

Feldkamp JR. y White JL. 1979. Acid-Base equilibria in clay suspension. *Journal of Colloid and Interface Science*. 69, 1, 91-106.

Felsot A.S. y Shelton D.R. 1993. Enhanced biodegradation of soil pesticides: Interactions between physicochemical processes and microbial ecology, pp. 227-271. In: *Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil*. SSSA Spec. Publ. No. 32. Soil Science Society of America, Madison, WI.

Fenner K., Canonica S., Wackett L.P., Elsner M. 2013. Evaluating pesticide degradation in the environment: Blind spots and emerging opportunities. *Science*. 341, 752-758.

Fernandes M.C., Cox L., Zsolany A., Hermosín M.C., Cornejo J. 2003. Organic amendments as affecting adsorption of fungicides by soils. Editado por: DelRe A.A.M.; Capri E.; Padovani L.; Trevisan M. *Pesticide in air, plant, soil and water system*. 12th Symposium on Pesticide Chemistry. Italy. 169-174.

Fernandes M.C. 2004. Comportamiento de plaguicidas en suelos de Andalucía Occidental y Bajo Alentejo: Efecto de la adición de enmiendas orgánicas. Tesis Doctoral.

Fernandes M.C., Cox L., Hermosín M.C., Cornejo J. 2006. Organic amendments affecting sorption, leaching and dissipation of fungicides in soils. *Pest Management Science*. 62, 1207-1215.

Fernández-Bayo J.D., Nogales R., Romero E. 2009. Assessment of three vermicomposts as organic amendments used to enhance diuron sorption in soils with low organic carbon content. *European Journal of Soil Science*. 60, 935-944.

Fernández-Pérez M., González-Pradas E., Ureña-Amate M. D., Wilkins R. M., Lindup I. 1998. Controlled release of imidacloprid from a lignin matrix: Water release kinetics and soil mobility study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 9, 3828-3834.

Ferreira J.A., Martin-Neto L., Vaz C.M.P., Regitano J.B. 2002. Sorption interactions between imazaquin and a humic acid extracted from a typical Brazilian Oxisol. *Journal of Environmental Quality*. 31, 5, 1665-1670.

FIFRA (Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act). 1947.

Flores-Céspedes F., González-Pradas E., Fernández-Pérez M., Villafranca-Sánchez M. 2002. Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil. *Journal of Environmental Quality*. 31, 880-888.

Galan E., Gomez-Ariza J.L., Gonzalez I., Fernandez-Caliani J.C., Morales E., Giraldez I. 2003. Heavy metal partitioning in river sediments severely polluted by acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt. *Applied Geochemistry*. 18, 3, 409-421.

Gamble D. S. y Khan S. U. 1985. Atrazine Hydrolysis in Soils - Catalysis by the Acidic Functional-Groups of Fulvic-Acid. *Canadian Journal of Soil Science*. 65, 3, 435-443.

Gámiz B., Celis R., Hermosín M.C., Cornejo J. 2010. Organoclays as soil amendments to increase the efficacy and reduce the environmental impact of the herbicide fluometuron in agricultural soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 7893-7901.

Gámiz B.M. 2012. Uso de residuos orgánicos y de arcillas modificadas para aumentar la eficacia de herbicidas y reducir la contaminación de suelos y aguas por los mismos en cultivos andaluces. Tesis Doctoral.

Ganigar R., Rytwo G., Gonen Y., Radian A., Mishael Y.G. 2010. Polymer-clay nanocomposites for the removal of trichlorophenol and trinitrophenol from water. *Applied Clay Science*. 49, 311-316.

Gennis B.R. 1989. *Biomembranes*. Springer-Verlag, London. 533.

Gerstl Z., Nasser A., Mingelgrin U. 1998. Controlled Release of Pesticides into Soils from Clay - Polymer Formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 9, 3797-3802.

Giles C. H., MacEwan T. H., Nakhwa S. N., Smith D. 1960. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 3973-3993.

Gillman G.P. 2010. Charged clays: An environmental solution. *Applied Clay Science*. 53, 3. 361-365.

Giovanela M., Crespo JS., Antunes M., Adamatti DS., Fernandes AN., Barison A., da Silva C.W.P., Guegan R., Motelica-Heino M., Sierra M.M.D. 2010. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids extracted from the bottom sediments of a Brazilian subtropical microbasin. *Journal of Molecular Structure*. 981, 1-3, 111-119.

Glottfelt D.E. y Schomburg C.I. 1989. Volatilization of pesticides from soil. En: *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils*. Pp. 181-207. SSSA Special Publication nº 33, Madison.

Goering H.K. y Van Soest P.J. 1970. Forage fiber analysis: Apparatus, reagents, procedures, and some applications, *Agric. Handbook* 379. USDA-ARS, Washington, DC.

González M., Mingorance M.D., Sanchez L., Pena A. 2008 Pesticide adsorption on a calcareous soil modified with sewage sludge and quaternary alkyl-ammonium cationic surfactants. *Environmental Science and Pollution Research*. 15, 1, 8-14.

Gordijo C., Barbosa C.A.S., da Costa Ferreira A.M., Constantino Vera R.L., de Oliveira Silva D. 2005. Immobilization of Ibuprofen and Copper-Ibuprofen Drugs on Layered Double Hydroxides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 94, 5.

Grayson R. y Holden J. 2012. Continuous measurement of spectrophotometric absorbance in peatland streamwater in northern England: implications for understanding fluvial carbon fluxes. *Hydrological Processes*. 26, 27-39.

Green, M.B. 1984. Los plaguicidas ¿Beneficiosos o perjudiciales?. *Academis León*.



- Greenland D.J. 1965. Interactions between clays and organic compounds in soils. Part I. Mechanisms of interaction between clays and defined organic compounds. *Soils and Fertilizers*. 28, 415–532.
- Grim RE. 1968. *Clay Mineralogy*, International Series in Earth and Planetary Science, McGraw-Hill Book Company, New York.
- Guenzi E.D. 1974. *Pesticide, Soil and Water*. Soil Science Society of America Inc. Wisconsin. 562.
- Gunawan P. y Xu R. 2007. Direct Control of Drug Release Behavior from Layered Double Hydroxides through Particle Interactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 97, 10.
- Günister E, Pestreli D., Ünlü C.H., Atici O., Güngör N. 2007. Synthesis and characterization of chitosan–MMT biocomposite systems. *Carbohydrate Polymers*. 67, 358–365.
- Guo L., Bicki T.J., Felsot A.S., Hinesly T. D. 1993. Sorption and movement of alachlor in soil modified carbo-rich wastes. *Journal of Environmental Quality*. 22, 186–194.
- Guo L., Jury W.A., Wagenet R.J., Flury M. 2000. Dependence of pesticide degradation on sorption: nonequilibrium model and application to soil reactors. *Journal Contaminant Hydrology*. 43, 45–62.
- Hanafi F, Assobhei O., Mountadar M. 2010 Detoxification and discoloration of Moroccan olive mil wastewater by electrocoagulation. *Journal of Hazardous Materials*. 174, 807–812.
- Hassouna M., Massiani C., Dudal Y., Pech N., Theraulaz F. 2010. Changes in water extractable organic matter (WEOM) in a calcareous soil under field conditions with time and soil depth. *Geoderma*. 155, 75–85.
- Hayes M.H.B. y Mingelgrin U. 1991. Interactions between small organic chemicals and soil colloidal constituents. En: Bolt GH et al., editors, *Interactions at the soil colloid-soil solution interface*. Boston: Kluwer Academic Publication. 323–407.
- Hayes M.H.B. y Swift R.S. 1978. The chemistry of soil organic colloids. 179–320. En D.J. Greenland and M.H.B. Hayes (ed.) *The chemistry of soil constituents*. John Wiley and Sons, Chichester, U.K.

Hederlain S. B. y Schawarzenbach R. P. 1993. Adsorption of substituted nitrobenzenes and nitrophenols to mineral surfaces. *Environmental Science and Technology*. 27, 316-328.

Hermosín M.C. y Pérez-Rodríguez J.L. 1981. Interaction of chlordimeform with clay minerals. *Clays and Clay Minerals*. 29, 143-152.

Hermosín M.C. y Cornejo J. 1987. Maleis hydrazide adsorption by soils and the use of the mole fraction from the Freundlich equation. *Soil Science*. 144, 6, 453-456.

Hermosín M.C., Ulibarri M.A., Mansour M., Cornejo J., 1992. Assaying sorbents for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid from water. *Fresenius Environmental Bulletin*. 1, 472-481.

Hermosín M.C. y Cornejo J. 1992. Removing 2,4-D from water by organo-clays. *Chemosphere*. 24, 10, p. 1493-1503.

Hermosín M.C. y Cornejo J. 1993. Binding mechanism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by organoclays. *Journal of Environmental Quality*. 22, 325-331.

Hermosín M. C., Pavlovic I., Ulibarri M. A., Cornejo J. 1993. Trichlorophenol adsorption on layered double hydroxide: A potential sorbent. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Environmental Science and Engineering*. 28, 9, 1875-1888.

Hermosín M.C., Pavlovic I., Ulibarri M.A., Cornejo J. 1996. Hydrotalcite as sorbent for trinitrophenol: sorption capacity and mechanism. *Water Research*. 30, 1, 171-177.

Hermosín M.C., Cornejo J., Cox L. 2000. Calculation and validation of K<sub>clay</sub> as predictor for polar or ionic pesticide adsorption by soils. En: *Pesticide/Soil Interactions. Techniques et partiques*. Editado por: Cornejo J. y Jamet P. 131-139.

Hermosín M.C., Calderon M.J, Real M., Cornejo J. 2013. Impact of herbicides used in olive groves on waters of the Guadalquivir river basin (southern Spain). *Agriculture Ecosystems and Environment*. 164, 229-243.

Hernandez-Moreno M.J., Ulibarri M.A., Rendon J.L., Serna C.J. 1985. IR characteristics of hydrotalcite-like compounds. *Physics and Chemistry of Minerals*. 12, 1, 34-38.

- Herwig U., Klumpp E., Narres H.D., Schwuger M.J. 2001. Physicochemical interactions between atrazine and clay minerals. *Applied Clay Science*. 18, 5-6, 211-222.
- Hole S.J., McClure N.C., Powles S.B. 2001. Rapid degradation of carbetamide upon repeated application to Australian soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 33, 6, 739-745.
- Horspool W.N. 1970. Aspects of organic photochemistry. Ed. Academic Press. Londres.
- Houri B., Legroui A., Barroug A., Forano C., Besse J. P. 1998. Use of the ionexchange properties of layered double hydroxides for water purification. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 63, 5, 732-740.
- Hull H.M. 1970. Leaf structure as related to absorption of pesticides and other compounds *Residue Reviews*. 31, 1-150.
- Huang P.M., Grover R., McKercher R.B. 1984. Components and particle size fractions involves in atrazine adsorption by soils. *Soil Science*. 138, 20-24.
- Illum L. y Davis S. 1998. Chitosan as a delivery system for the transmucosal administration of drugs. *Polysaccharides structural Diversity and functional versatility*. Second Edition. 643-660.
- Inacio J., Taviot-Guého C., Forano C., Besse J. P. 2001. Adsorption of MCPA pesticide by MgAl-layered double hydroxides. *Applied Clay Science*. 18, 255-264.
- Inomata K. y Ogawa M. 2006. Preparation and Properties of Mg/Al Layered Double Hydroxide-Oleate and -Stearate Intercalation Compounds. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 79, 2, 336-342.
- Itoh T., Ohta N., Shichi T., Yui T., Takagi K. 2003. The self-assembling properties of stearate ions in hydrotalcite clay composites. *Langmuir*. 19, 22, 9120-9126.
- I.U.P.A.C. 1994. Recommendations for the characterization of porous solids. *Pure and Applied Chemistry*. 57, 603-619.
- Iyi N., Tamura K., Yamada H. 2009. One-pot synthesis of organophilic layered double hydroxides (LDHs) containing aliphatic carboxylates: Extended "homogeneous precipitation" method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 340, 67-73.

Jaffrain J., Gérard F. Meyer M., Ranger J. 2007. Assessing the quality of dissolved organic matter in forest soils using ultraviolet absorption spectrophotometry. *Soil Science Society of America*. 71, 6, 1851-1858.

Jarvis N.J. 2007. A review of non-equilibrium water flow and solute transport in soil macropores: principles, controlling factors and consequences for water quality. *European Journal of Soil Science*. 58, 523-546.

Jayakumar R., Prabakaran M., Nair S.V., Tokura S., Tamura H., Selvamurugan N. 2010. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Progress in Materials Science*. 55, 675-709.

Jaynes W.F. y Boyd S.A. 1991. Hydrophobicity of siloxanes surfaces in smectites as revealed by aromatic hydrocarbon adsorption from water. *Clays and Clay Minerals*. 39, 428-436.

Jaynes W.F. y Vance G.F. 1996. BTEX sorption by organoclays: cosorptive enhancement and equivalence of interlayer complexes. *Soil Science Society American Journal*. 60, 1742-1749.

Jia N., Li S.M., Ma M.G., Sun R.C., Zha J.F. 2012. Hydrothermal fabrication, characterization, and biological activity of cellulose/CaCO<sub>3</sub> bionanocomposites. *Carbohydrates Polymers*. 88, 179-184.

Jiang J., Zhu JH., Ding RM., Li YY., Wu F., Liu JP., Huang XT. 2011. Co-Fe layered double hydroxide nanowall array grown from an alloy substrate and its calcined product as a composite anode for lithium-ion batteries. *Journal of Materials Chemistry*. 21, 40, 15969-15974.

Johansen S.S., Hansen A.B., Mosbaek H., Arvin E. 1997. Identification of heteroaromatic and other organic compounds in ground water at creosote-contaminated sites in Denmark. *Groundwater Monitoring and Remediation*. 17, 2, 106-115.

Johnston C.T. 2010. Probing the nanoscale architecture of clay minerals. *Clay Minerals*. 45, 245-279.

Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente. 2012. El impulso de la Junta al compostaje de subproductos agrarios permite aumentar la producción anual. <http://www.besana.es>

Kaiser K. y Zech W. 2000. Dissolved organic matter sorption by mineral constituents of subsoil clay fractions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 163, 5, 531-535.

- Kalbitz K., Schmerwitz J., Schwesig D., Matzner E. 2003. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma*. 113, 3-4, 273-291.
- Kameda T., Miyano Y., Yoshioka T., Uchida M., Okuwaki A. 2000. New treatment methods for waste water containing chloride ion using magnesiumaluminum oxide. *Chemistry Letters*. 10, 1136-1137.
- Kameshima Y., Yoshizaki H., Nakajima A., Okada K. 2006. Preparation of sodium oleate/layered double hydroxide composites with acid-resistant properties. *Journal of Colloid and Interface Science*. 298, 2, 624-628.
- Kang M.J., Rhee S.W., Moon H., Neck V., Fanghanel T. 1996. Sorption of  $\text{MO}(4)(-)$  ( $\text{M}=\text{Tc}, \text{Re}$ ) on  $\text{Mg}/\text{Al}$  layered double hydroxide by anion exchange. *Radiochimica Acta*. 75, 3, 169-173.
- Karathanasis A.D., Adams A.D.F., Hajek B.F. 1983. Stability relationships in kaolinite, gibbsite and  $\text{Al}$ -hydroxy interlayered vermiculite soil systems. *Soil Science Society American Journal*. 3, 1247-1251.
- Karickhoff S.W. 1981. Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere*. 10, 8, 833-846.
- Khan S.U. 1980. Physicochemical processes affecting pesticides in soil. En: *Pesticides in the soil environment* (ed. R.J. Wakeman). Elsevier Science Publication. Amsterdam. 29-118.
- Khan S.U. 1982. Bound pesticide residues in soil and plants. *Residue Reviews*. 84, 1-25.
- Kinniburgh D. 1986. General purpose adsorption isotherms. *Environmental Science and Technology*. 20, 895-904.
- Korshin G.V., Kumke M.U., Li C.W., Frimmel F.H. 1999. Influence of chlorination on chromophores and fluorophores in humic substances. *Environmental Science and Technology*. 33, 8, 1207-1212.
- Kotta E., Kalogerakis N., Mantzavinos D. 2007. The effect of solids on the electrochemical treatment of olive mill effluents. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 82, 5, 504-511.
- Kovanda F., Kováčsová E., Koloušek D. 1999. Removal of anions from solution by calcined hydrotalcite and regeneration of used sorbent in repeated calcination-rehydration-anion exchange processes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 64, 1517-1528.

- Kittinaovarat S., Kansomwan P., Jiratumnukul N. 2010. Chitosan/modified montmorillonite beads and adsorption Reactive Red 120. *Applied Clay Science*. 48, 87–91.
- Knicker H. 2011. Solid state CPMAS  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy in organic geochemistry and how spin dynamics can either aggravate or improve spectra interpretation. *Organic Geochemistry*. 42, 867–890.
- Komilis D.P. y Ham R.K. 2003. The effect of lignin and sugars to the aerobic decomposition of solid wastes. *Waste Management*. 23, 419–423.
- Kononova M.M. 1966. *Soil Organic Matter*. Pergamon, Oxford. 190–199.
- Kookana R.S., Di H.J., Aylmore L.A. 1995. A field study of leaching and degradation of nine pesticides in a sandy soil. *Australian Journal of Soil Research*. 33, 6, 1019–1030.
- Kuivila K.M. y Foe C.G. 1995. Concentrations, transport and biological effects of dormant spray pesticides in the San Francisco Estuary, California. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14, 7, 1141–1150.
- Laabs V., Amelung W., Pinto A., Zech W. 2002. Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. *Journal of Environmental Quality*. 31, 1, 256–268.
- Labajos F.M., Rives V., Ulibarri M.A. 1991. A FT-IR and V-UV spectroscopic study of nickel-containing hydrotalcite-like compounds,  $[\text{Ni}_1\text{-XAl}_x(\text{OH})_2](\text{CO}_3)_x/2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ . *Spectroscopy Letters*. 24, 4, 499–508.
- Labajos F.M., Rives V., Ulibarri M.A. 1992. Effect of hydrothermal and thermal treatments on the physicochemical properties of Mg-Al hydrotalcite-like materials. *Journal of Material Science*. 27, 6, 1546–1552.
- Ladewig K., Niebert M., Xu Zhi P., Gray P.P., Lu Gao Q.M. 2010. Efficient siRNA delivery to mammalian cells using layered double hydroxide nanoparticles. *Biomaterials*. 31, 1821–1829.
- Laird D.A. 1996. Interactions between atrazine and smectite surfaces. *Herbicide Metabolites in Surface Water and Groundwater*. 630, 86–100.
- Lagaly G., Weiss A., Stuke E. 1977. Effect of double-bonds on biomolecular films in membrane models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 470, 331–341.
- Lagaly G. 1981. Characterization of clays by organic-compounds. *Clay Minerals*. 16, 1, 1–21.

Lagaly G. 1994. Bentonites: adsorbents of toxic substances. *Surfactants and Colloids in the Environment Progress in Colloid and Polymer Science*. 95, 61-72.

Lagaly G. 2001. Pesticide-clay interactions and formulations. *Applied Clay Science*. 18, 205-209.

Lakraimi M., Legrouri A., Barroug A., De Roy A., Besse J.P. 1999. Removal of pesticides from water by anionic clays. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*. 96, 3, 470-478.

Lazaridis N.K. y Asouhidou D.D. 2003. Kinetics of sorptive removal of chromium (VI) from aqueous solutions by calcined Mg-Al-CO<sub>3</sub> hydrotalcite. *Water Research*. 37, 2875-2882.

Legrouri A., Badreddine M., Barroug A., De Roy A., Besse J. P. 1999. Influence of pH on the synthesis of the Zn-Al-nitrate layered double hydroxide and the exchange of nitrate by phosphate ions. *Journal of Materials Science Letters*. 18, 13, 1077-1079.

Li F., Zhang L., Evans D. G., Forano C. y Duan X. 2004. Structure and thermal evolution of Mg-Al layered double hydroxide containing interlayer organic glyphosate anions. *Thermochimica Acta*. 424, 1-2, 15-23.

Li F. y Duan X. 2005. Applications of layered double hydroxides. Evans, D. G. and Duan, X. 119, 193-223.

Linares A., Manuel Caba J., Ligeró F., de la Rubia T., Martínez J. 2003. Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavidio-alba*. *Chemosphere*. 51, 887-891.

López-Piñeiro A., Albarrán A., Rato Nunes J.M., Peña D., Cabrera D. 2011. Long-term impacts of de-oiled two-phase olive mill waste on soil chemical properties, enzyme activities and productivity in an olive grove. *Soil and Tillage Research*. 114, 175-182.

Madejón E., Burgos P., López R., Cabrera F. 2003. Agricultural use of three organic residues: effect on orange production and on properties of a soil of the 'Comarca Costa de Huelva' (SW Spain). *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 65, 281-288.

Madejová J. y Komadel P. 2001. Baseline studies of the Clay Minerals Society source clays: infrared methods. *Clays and Clay Minerals*. 49, 410-432.

- Maila M.P. y Cloete T.E. 2002. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 50, 2, 107-113.
- Mandelbaum R.T., Allan D.L., Wackett L.P. 1995. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 1451-1457.
- Mansour M., Feicht E., Mealier P. 1989. Improvement of the photostability of selected substances in aqueous medium. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 20-21, 139-147.
- Manzi-Nshuti C., Songtpiya P., Manias E., Jimenez-Gasco M.M., Hossenlopp J.M., Wilkie C.A. 2009. Polymer nanocomposites using zinc aluminum and magnesium aluminum oleate layered double hydroxides: Effects of the polymeric compatibilizer and of composition on the thermal and fire properties of PP/LDH nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability*. 94, 2042-2054.
- Margulies L., Stern T., Rubin B. 1994. Slow-Release of S-Ethyl Dipropylcarbamothioate from Clay Surfaces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 5, 1223-1227.
- Martín-Diana A.B., Rico D., Barat J.M., Barry-Ryan C. 2009. Orange juices enriched with chitosan: Optimisation for extending the shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 590-600.
- Martinez B., Tomkins J., Wackett L.P., Wing R., Sadowsky M.J. 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of Bacteriology*. 183, 5684-5697.
- Martins J.M. y Mermoud A. 1998. Sorption and degradation of four nitroaromatic herbicides in mono and multi-solute saturated/unsaturated soil batch systems. *Journal of Contaminant Hydrology*. 33, 187-210.
- Melero S., Madejón E., Ruiz J.C., Herencia J.F. 2007. Chemical and biochemical properties of a clay soil under dryland agriculture system as affected by organic fertilization. *European Journal of Agronomy*. 26, 327-334.
- Meng J., Zhang H., Evans D.G., Duan X. 2005. Novel layered pesticide slow/controlled release materials - Supramolecular structure and slow release property of glyphosate intercalated layered double hydroxides. *Chinese Science Bulletin*. 50, 8, 745-751.
- Merkle M.G. y Bovey R.W. 1974. Movement of pesticides in surface water (merkel), in WD Guenzi ed., *Pesticides in soil and water: Wisconsin*, Madison. 95-105.



- Mersie W. y Foy C.L. 1985. Phytotoxicity and adsorption of chlorsulfuron as affected by soil properties. *Weed Science*. 33, 564-568.
- Meyn M., Beneke K., Lagaly G. 1990. Anion-Exchange Reactions of Layered Double Hydroxides. *Inorganic Chemistry*. 29, 5201-5207.
- Minero C., Lauri V., Falletti G., Maurino V., Pelizzetti E., Vione D. 2007. Spectrophotometric characterisation of Surface lakewater samples: Implications for the quantification of nitrate and the properties of dissolved organic matter. *Annali di Chimica*. 97, 1107-1116. By Società Chimica Italiana.
- Miyata S. 1975. Syntheses of hydrotalcite-like compounds and their structures and physicochemical properties.1. Systems  $Mg^{2+}-Al^{3+}-NO_3^-$ ,  $Mg^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$ ,  $Mg^{2+}-Al^{3+}-ClO_4^-$ ,  $Ni^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$  AND  $Zn^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$ . *Clays and Clay Minerals*. 23, 5: 369-&
- Miyata S. 1980. Physicochemical properties of synthetic hydrotalcites in relation to composition. *Clays and Clay Minerals*. 28, 50-56.
- Miyata S. 1983. Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds. *Clays and Clay Minerals*. 31, 4, 305-311.
- Monvisade P. y Siriphannon P. 2009. Chitosan intercalated montmorillonite: preparation, characterization and cationic dye adsorption. *Applied Clay Science*. 42, 427-431.
- Moore D.M. y Reynolds R.C. 1997. X-Ray diffraction and identification and analysis of clay minerals, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Mortland M.M., Shaobai S., Boyd S.A. 1986. Clay-organic complexes as adsorbents for phenol and chlorophenols. *Clays and Clay Minerals*. 34, 5, 581-585.
- Mortland M.M., 1970. Clay-organic complexes and interactions. En "Advances in Agronomy". Prepared under the Auspices of the American Society of Agronomy. Vol. 22, pp 75-117. Edited by N.C. Brady. Academic Press. New York and London.
- Muncharaz M. 1999. Utilización del alpechín en fertilización de tierras agrícolas. *Revista Comunidad Valenciana Agraria*. 13, 50-56.
- Murphy E.M., Zachara J.M., Smith S.C., Phillips J.L., Wietsma T.W. 1994. Interaction of hydrophobic organic compounds with mineral-bound humic substances. *Environmental Science and Technology*. 28, 1291-1299.

Nair D.R y Schnoor J.L. 1994. Effect of soil conditions on model parameters and atrazine mineralization rates. *Water Research*. 28, 1199-1205.

Nam H.-J., Ebina T., Mizukami F. 2009. Formability and properties of self-standing clay film by montmorillonite with different interlayer cations. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*. 346, 1-3, 158-163.

Nearpass D.C. 1976. Adsorption of Picloram by Humic Acids and Humin. *Soil Science*. 121, 5, 272-277.

Nir S., Undabeytia T., Yaron-Marcovich D., El-Nahhal Y., Polubesova T., Serban C., Rytwo G., Lagaly G., Rubin B. 2000. Optimization of adsorption of hydrophobic herbicides on montmorillonite preadsorbed by monovalent organic cations: Interaction between phenyl rings. *Environmental Science and Technology*. 34, 7, 1269-1274.

Oades J.M. 1984. Interactions of polycations of aluminium and iron with clays. *Clays and Clay Minerals*. 32, 1, 49-57.

Ohno T., Chorover J., Omoike A., Hunt J. 2007. Molecular weight and humification index as predictors of adsorption for plant- and manure-derived dissolved organic matter to goethite. *European Journal Soil Science*. 58, 125- 132.

Otero R., Fernandez J.M., Ulibarri M.A., Celis R., Bruna F. 2012. Adsorption of non-ionic pesticide S-Metolachlor on layered double hydroxides intercalated with dodecylsulfate and tetradecanedioate anions. *Applied Clay Science*. 65-66, 72-79.

Orthman J., Zhu H.Y., Lu G.Q. 2003. Use of anion clay hydrotalcite to remove coloured organics from aqueous solutions. *Separation and Purification Technology*. 31, 1, 53-59.

Panettieri M. 2013. Secuestro de carbono y mejora de la calidad del suelo bajo laboreo de conservación en condiciones Mediterráneas (SO de Andalucía). Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Parbhakara A., Cuadros J., Sephton M.A., Dubbin W., Coles B.J., Weiss D. 2007. Adsorption of L-lysine on montmorillonite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 307, 1-3, 142-149.

Parker L.W. y Doxtader K.G. 1983. Kinetics of the microbial degradation of 2,4-D in soil: Effects of temperature and moisture. *Journal of Environmental Quality*. 12, 553-558.

- Pavan P.C., Crepaldi E.L., Valim J.B. 2000. Sorption of anionic surfactants on layered double hydroxides. *Journal of Colloid and Interface Science*. 229, 346-352.
- Pavlovic I., Ulibarri M.A., Hermosin M.C., Cornejo J. 1996. Pesticide adsorption on organo-hydrotalcites. En *Proceedings of the Spanish-Italian Meeting on Clay Minerals held in Granada, Spain*. *Advances in clay minerals* 19-21. Edited by M Ortega-Huertas, A López-Galindo and I palomo-Delgado.
- Pavlovic I., Ulibarri M.A., Hermosín M.C., Cornejo J. 1997. Sorption of an anionic surfactant from water by a calcined hydrotalcite-like sorbent. *Fresenius Environmental Bulletin*. 6, 5-6, 266-271.
- Pavlovic I., Barriga C., Hermosín M.C., Cornejo J., Ulibarri M.A. 2005. Adsorption of acidic pesticides 2,4-D, Clopyralid and Picloram on calcined hydrotalcite. *Applied Clay Science*. 30, 125-133.
- Pavlovic I., González M.A., Rodríguez-Rivas F., Ulibarri M.A., Barriga C. 2013. Caprylate intercalated layered double hydroxide as adsorbent of the linuron, 2,4-DB and metamitron pesticides from aqueous solution *Applied Clay Science*. 80-81, 76-84.
- Perrin-Ganier C., Sciavon F., Morel J.L., Schiavon M. 2001. Effect of sludgeamendment or nutrient addition on the biodegradation of the herbicide isoproturon in soil. *Chemosphere*. 44, 887-892.
- Pignatello J.J. y Xing B. 1996. Mechanisms of Slow Sorption of Organic Chemicals to Natural Particles. *Environmental Science and Technology*. 30, 1, 1-11.
- Piirsoo K, Viik M., Kõiv T., Käiro K., Laas A., Nõges T., Pall P., Selberg A., Toomsalu L., Vilbaste S. 2012. Characteristics of dissolved organic matter in the inflows and in the outflow of Lake Võrtsjärv, Estonia. *Journal of Hydrology*. 475, 306-313.
- Philen O.D., Weed S.B., Weber J.B. 1971. Surface charge characterization of layer silicates by competitive adsorption of two organic divalent cations. *Clays and Clay Minerals*. 19, 295-302.
- Prost R. y Yaron B. 2001. Use of modified clays for controlling soil environmental quality. *Soil Science*. 166, 880-895.
- Pusino A., Liu W., Gessa C. 1994. Adsorption of Triclopyr on soil and some of its components. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 42, 1026-1029.

Qiu D., Li Y., Fu X., Jiang Z., Zhao X., Wang T., Hou W. 2009. Controlled-release of avermectin from organically modified hydrotalcite-like compound nanohybrids. *Chinese Journal of Chemistry*. 27, 445-451.

Radian A. y Mishaal Y.G. 2008. Characterizing and designing polycation-clay nanocomposites as a basis for imazapyr controlled release formulations. *Environmental Science Technology*. 42, 1511-1516.

Ramos-Cormenzana A., JuárezJimenez B., GarcíaPareja M.P. 1996. Antimicrobial activity of olive mill waste-waters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 38, 3-4, 283-290.

Rav-Acha CH. y Rebhun M. 1992. Binding of organic solutes to dissolved humic substances and its effects on adsorption and transport in the aquatic environment. *Water Research*. 26, 12, 1645-1654.

Real M. 2010. Adsorción, persistencia y movilidad de compuestos orgánicos polares contaminantes de suelos. Tesis Doctoral.

Reichle W.T. 1986. Synthesis of anionic clay minerals (mixed metal hydroxides, hydrotalcite). *Solid State Ionics*. 22, 1, 135-141.

Reichle W.T., Kang SY., Everhardt D.S. 1986. The nature of the thermal-decomposition of a catalytically active anionic clay mineral. *Journal of Catalysis*. 101, 2, 352-359.

Renault F., Sancey B., Badot P.-M., Crini G. 2008. Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach. *European Polymer Journal*. 45, 1337-1348.

Rives V. 2001. Layered double hydroxides: present and future, Nova Science Publishers, Inc., New York.

Rives V. 2002. Characterisation of layered double hydroxides and their decomposition products. *Materials Chemistry and Physics*. 75, 19-25.

Rives V., Carriazo D., Martín C. 2010. Pillared clays and related catalysts, in A Gil, SA Korili, R Trujillano, and MA Vicente eds., *Pillared clays and related catalysts*: Springer. 319-397.

Rodríguez-Cruz M.S., Sánchez-Martin M.J., Andrades M.S., Sánchez-Camazano M., 2007. Modification of clay barriers with a cationic surfactant to improve the retention of pesticides in soils. *Journal Hazardous Materials*. 139, 363-372.

- Rodríguez-Lucena P., Hernández D., Hernández-Apaolaza L., Lucena J.J. 2010. Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 1085-1092.
- Roig A., Cayuela M.L., Sánchez-Monedero M.A. 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*. 26, 960-969.
- Roig N., Sierra J., Martí E., Nadal M., Shuhmacher M., Domingo J.L. 2012. Long-term amendment of Spanish soils with sewage sludge: Effects on soil functioning. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 158, 41-48.
- Romero A., Gonzalez I., Galan E. 2006. Estimation of potential pollution of waste mining dumps at Pena del Hierro (Pyrite Belt, SW Spain) as a base for future mitigation actions. *Applied Geochemistry*. 21, 7, 1093-1108.
- Roth C.B., Jackson M.L., Lotse E.G., Syers J.K. 1968. Ferrous-ferric ratio and CEC changes on deferration of weathered micaceous vermiculite. *Israel Journal Chemistry*. 6, 261-273.
- Roy C., Gaillardon P., Montfort F. 2000. The effect of soil moisture content on the sorption of five sterol biosynthesis inhibiting fungicides as a function of their physicochemical properties. *Pest Management Science*. 56, 9, 795-803.
- Russell J.D., Cruz M.I., White J.L. 1968. The adsorption of 3-aminotriazole by montmorillonite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 16, 21-24.
- Rutherford D.W., Chiou C.T., Kile D.E. 1992. Influence of Soil Organic-Matter Composition on the Partition of Organic-Compounds. *Environmental Science and Technology*. 26, 2, 336-340.
- Saegusa T. 1991. Organic polymer silica-gel hybrid – a precursor of highly porous silica-gel. *Journal of Macromolecular Science-Chemistry*. 128, 817-828.
- Sánchez-Martín M.J., Villa M.V., Sánchez-Camazano M. 1999. Glyphosatehydrotalcite interaction as influenced by pH. *Clays and Clay Minerals*. 47, 777-783.
- Sánchez L., Romero E., Sánchez-Rasero F.S., Dios G., Pena A. 2003. Enhanced soil sorption of methidathion using sewage sludge and surfactants. *Pest. Management Science*. 59, 8, 857-864.
- Sarkar B., Venkateswralu N., Nageswara Rao R., Chiranjib Bhattacharjee, Vijay Kale. 2006. Treatment of pesticide contaminated surface water for production of potable water by a coagulation-adsorption-nanofiltration approach. *Desalination*. 212, 129-140.

Sato T. y Okuwaki A. 1991. Intercalation of benzenecarboxylate ions into the interlayer of hydrotalcite. *Solid State Ionics*. 45, 1-2, 43-48.

Scheidegger A.M. y Sparks D.L. 1996. A critical assessment of sorption-desorption mechanisms at the soil mineral/water interface. *Soil Science*. 161, 12, 813-831.

Schnitzer M. 1978. Humic substances: Chemistry and reactions.

Schulz R. 2001. Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the Lourens River, Western Cape, South Africa: Importance of a single event. *Water Research*. 35, 8, 1869-1876.

Schulz R. y Dabrowski J.M. 2001. Combined effects of predatory fish and sublethal pesticide contamination on the behavior and mortality of mayfly nymphs. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20, 11, 2537-2543.

Scow K. M. y Hutson J. 1992. Effect of Diffusion and Sorption on the Kinetics of Biodegradation - Theoretical Considerations. *Soil Science Society of America Journal*. 56, 1, 119-127.

Senesi N. y Chen Y. 1986. Interactions of Toxic Organic Chemicals with Humic Substances. *Toxic Organic Chemicals in Porous Media Ecological Studies*. 73, 37-90.

Senesi N., Miano T.M., Provenzano M.R., Brunetti G. 1991. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*. 152, 4, 259-271.

Senesi N. 1992. Binding Mechanisms of Pesticides to Soil Humic Substances. *Science of the Total Environment*. 123, 63-76.

Senesi N., LaCava P., Miano T.M. 1997. Adsorption of imazethapyr to amended and nonamended soils and humic acids. *Journal of Environmental Quality*. 26, 5, 1264-1270.

Serna C.J., White J.L., Hem S.L. 1977. Hydrolysis of aluminum-tri-(secbutoxide) in ionic and nonionic media. *Clays and Clay Minerals*. 25, 6, 384-391.

Shahidi F. y Synowiecki J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry (American Chemical Society)*. 39, 8, 1527-1532.

Schwarzenbach R.P. 1993. Organic contaminants in water. En: Abstracts of papers of the American Chemical Society. 205, 278-CHED

Shea P. J. y Weber J. B. 1983. Effect of soil pH on flouiridone activity and persistence as determinated by chlorophyl measurements. *Weed Science*. 31, 347-350.

Shen Y.M. 1999. Sorption of natural dissolved organic matter on soil. *Chemosphere*. 38, 7, 1505-1515.

Shin H.S., Kim M.J., Nam S.Y., Moon H.C. 1996. Phosphorus removal by hydrotalcite-like compounds (HTLcs). 34, 161-168. Singapore, Singapore. Proceedings of the 1996 18th Biennial Conference of the International Association on Water Quality. Part 1.

Si Y., Zhang J., Wang S., Zhang L., Zhou D. 2006. Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethametsulfuron-methyl in acidic soils in China. *Geoderma*. 130, 66-76.

Si Y., Wang M., Tian C., Zhou J., Zhou D. 2011. Effect of charcoal amendment on adsorption, leaching and degradation of isoproturon in soils. *Journal of Contaminant Hydrology*. 123, 1-2, 75-81.

Smith C. R. 1934. Base Exchange Reactions of Bentonite and Salts of Organic Bases. *Journal of the American Chemistry Society*., 1934, 56 (7), pp 1561-1563  
DOI: 10.1021/ja01322a032  
Publication Date: July 1934

Socias-Viciana M.M., Hermosín M.C., Cornejo J. 1998. Removing prometrone from water by clays and organic clays. *Chemosphere*. 37, 2, 289-300.

Spark K.M. y Swith R.S. 1994. Investigation of some of the parameters affecting the fluorescence spectra of humic substances. En *Humic substances in the global environment and implication on human health*. (eds. Senetis and T. m. Miano) Elsevier, Amsterdam. 153-160.

Suhadolc M., Schroll R., Hagn Al., Dörfler U., Schlöter M., Lobnik F. 2010. Single application of sewage sludge - Impact on the quality of an alluvial agricultural soil. *Chemosphere*. 81, 1536-1543.

Tan K.H. 2003. *Humic Matter in Soil and the Environment: Principles and Controversies*.

Taylor A.W. y Spencer W.F. 1990. Volatalization and vapour transport processes, in HH Cheng ed., *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modeling*: Madison, WI, Soil Science Society of America. 213-269.

Tester C.F. 1990. Organic amendment effects on physical and chemical properties of a sandy soil. Soil Science Society American Journal. 54, 827-831.

Thanou M. y Junginger H.E. 1998. Pharmaceutical Applications of chitosan and derivatives. Polysaccharides structural Diversity and functional versatility. Second Edition. 661-678.

The Clay Mineral Society. 20/6/2013.  
<http://www.clays.org/SOURCE%20CLAYS/SCdata.html>.

Theng B.K.G., Greenland D.J., Quirk J.P. 1967. Adsorption of alkylammonium cations by montmorillonite. Clay Minerals. 7, 1-17.

Theng B.K.G. 1979. Formation and properties of clay-polymer complexes. Elsevier, Amsterdam. 283.326.

Theng B.K.G. 1982. Clay-polymer interactions – Summary and perspectives. Clays and Clay Minerals. 30, 1, 1-10.

Thomas R.G. 1982. Volatilization from soil, in WJ Lyman, WP Reehl, and DH Rosenblatt eds., Handbook of chemical property estimations methods: New York, McGraw Hill. 1-50.

Tichit D., Bennani M.N., Figueras F., Ruiz J.R. 1997. Decomposition processes and characterization of the surface basicity of  $\text{Cl}^-$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  hydrotalcites. Langmuir 14, No.8, 1998-2087.

Tilman D., Cassman K.G., Matson P.A., Naylor R., Polasky S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature. 418, 671-677.

Tipping E., Woof C., Backes C.A., Ohnstad M. 1988. Aluminium speciation in acidic natural waters: Testing of a model for al-humic complexation. Water Research. 22, 3, 321-326.

Tomlin C.D.S., 2006. The Pesticide Manual, fourteenth Ed., British Crop Protection Council, Hampshire, U.K.

Topp E., Mulbry W.M., Zhu H., Nour S.M., Cuppels D. 2000. Characterization of S-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioide* sp isolated from agricultural soils. Applied and Environmental Microbiology. 66, 3134-3141.

Toraishi T., Nagasaki S., Tanaka S. 2002. Adsorption behavior of  $\text{IO}_3^-$  by  $\text{CO}_3^{2-}$  and  $\text{NO}_3^-$ -hydrotalcite. Applied Clay Science. 22, 1-2, 17-23.

Torrents A. y Jayasundra S. 1997. The sorption of nonionic pesticides on to clays and the influence of natural organic carbon. Chemosphere. 35, 7, 1549-1565.



- Trigo C., Celis R., Hermosín M.C., Cornejo J. 2009. Organoclay-Based Formulations to Reduce the Environmental Impact of the Herbicide Diuron in Olive Groves. *Soil Science Society of America Journal*. 73, 5, 1652-1657.
- Trigo C., Koskinen W.C., Celis R., Dadowsky M.J., Hermosín M.C., Cornejo J. 2010. Bioavailability of organoclay formulations of atrazine in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 11857-11863.
- Trigo C. 2010. Evaluación de formulaciones basadas en minerales de arcilla para aumentar la eficacia y reducir la contaminación de aguas superficiales y subterráneas por herbicidas utilizados en el olivar. Tesis Doctoral.
- Ulibarri M.A., Pavlovic I., Hermosín M.C., Cornejo J. 1995. Hydrotalcite-Like Compounds As Potential Sorbents of Phenols from Water. *Applied Clay Science*. 10, 1-2, 131-145.
- Ulibarri M.A. y Hermosín M.C. 2001. Layered double hydroxides in water decontamination. En: *Layered Double Hydroxides: Present and Future* (Chapter 9). V. Rives (ed). Nova Science Publishers, Inc. NY. 251-284.
- Ulibarri M.A., Pavlovic I., Barriga C., Hermosín M.C., Cornejo J. 2001. Adsorption of anionic species on hydrotalcite-like compounds: effect of interlayer anion and crystallinity. *Applied Clay Science*. 19, 17-27.
- Undabeytia T., Nir S., Rubin B. 2000. Organo-clay formulations of the hydrophobic herbicide norflurazon yield reduced leaching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 10, 4767-4773.
- Undabeytia T., Mishael Y.G., Nir S., Papahadjopoulos-Sternberg B., Rubin B., Morillo E., Maqueda C. 2003. A novel system for reducing leaching from formulations of anionic herbicides: clay-liposomes. *Environmental. Science and Technology*. 37, 4475-4480.
- Usaquén O.L., García Gómez A., García Gómez A., Álvarez Díaz C., Revilla Cortezón J.A. 2008. Methodology to assess sustainable management of water resources in coastal lagoons with agricultural uses: An application to the Albufera lagoon of Valencia (Eastern Spain). *Ecological Indicators*. 13, 1, 129-143.
- Vaccari A. 1999. Clays and catalysis: A promising future. *Applied Clay Science*. 14, 4, 161-198.
- Van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Zehnder A.J.B. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*. 54, 1, 75-87.

Voudrias E.A. 2002. The concept of sorption chemical barrier for improving effectiveness of landfill liner. *Waste Management and Research*. 20, 251-258.

Villa M.V., Sánchez-Martín M.J., Sánchez-Camazano M. 1999. Hydrotalcites and organo-hydrotalcites as sorbents for removing pesticides from water. *Journal of environmental science and health part B. Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*. 34, 509-525.

Visser S.A. 1983. Comparative study on the elementary composition of fulvic and humic acids of aquatic origin and from soils and microbial substrates. *Water Research*. 17, 10, 1393-1396.

Wagner S.C y Zablotowicz R.M. 1997. Effect of organic amendments on the bioremediation of cyazine and fluometuron in soil. *Journal of Enviromental Science Health. B*. 32, 37-54.

Waksman S.A. 1936. Humus Origin, Chemical Composition, and Importance in Nature. *Soil Science*. 41, 5, 395.

Walker A., Cotterill E.G, Welch S.J. 1989. Adsorption and degradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl in soils from differents depths. *Weed Research*. 29, 281-287.

Walker A. y Welch S.J. 1989. The relative movement and persistence in soil of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl and triasulfuron. *Weed Research*. 29, 375-383.

Wallage Z.E. y Holden J. 2010. Spatial and temporal variability in the relationship between water colour and dissolved organic carbon in blanket peat pore waters. *Science of the Total Environment*. 408, 6235-6242.

Wang B., Zhang H., Evans D.G, Duan X. 2005. Surface modification of layered double hydroxides and incorporation of hydrophobic organic compounds. *Materials Chemistry and Physics*. 92, 190-196.

Wang L. y Wang A. 2007. Adsorption characteristics of Congo Red onto the chitosan/montmorillonite nanocomposite. *Journal of Hazardous Materials*. 147, 979-985.

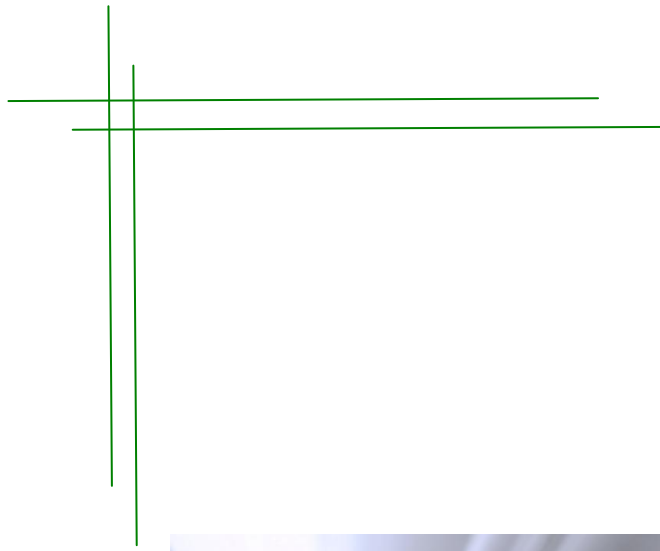
Wang Q., Tay H.H., Guo Z., Chen L., Liu Y., Chang J., Zhong Z., Luo J., Borgna A. 2012. Morphology and composition controllable synthesis of Mg-Al-CO<sub>3</sub> hydrotalcites by tuning the synthesis pH and the CO<sub>2</sub> capture capacity. *Applied Clay Science*. 55, 18-26.

Wauchope R.D. 1978. Pesticide Content of Surface-Water Draining from Agricultural Fields - Review. *Journal of Environmental Quality*. 7, 4, 459-472.

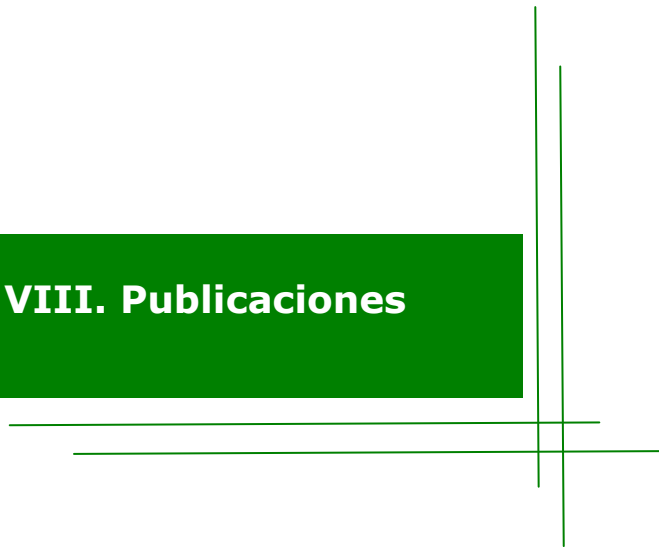
- Wauchope R.D. y Myers R.S. 1985. Adsorption-desorption kinetics of atrazine and linuron in freshwater-sediment aqueous slurries. *Journal of Environmental Quality*. 14, 1, 132-136.
- Weber SB. y Weed JB. 1968. Effect of adsorbent charge on competitive adsorption of divalent organic cations by layer-silicate minerals. *American Mineralogist*. 53, 3-4, 478-&.
- Weber J.B., Monaco T.J., Worsham A.D. 1973. What happens to herbicides in the environment? *Weeds Today*. 4, 22, 16-17.
- Weed S.B. y Weber J.B. 1969. The Effect of Cation Exchange Capacity on the Retention of Diquat<sup>2+</sup> and Paraquat<sup>2+</sup> by Three-Layer Type Clay Minerals I. Adsorption and Release. *Soil Science Society American Journal*. 33, 379-382.
- Worrall F., Parker A., Rae J. E., John A. C. 1999. A study of suspended and colloidal matter in the leachate from lysimeters and its role in pesticide transport. *Journal of Environmental Quality*. 28, 595-604.
- Worrall F., Fernandez-Perez M., Johnson A.C., Flores-Cespedes F., Gonzalez-Pradas E. 2001. Limitations on the role of incorporated organic matter in reducing pesticide leaching. *Journal of Contaminant Hydrology*. 49, 241-262.
- Wypych F. y Satyanarayana K.G. 2004. *Clay surfaces; fundamentals and applications* Amsterdam, Elsevier.
- Xu Z.P., Braterman P.S., Yu K., Xu H., Wang Y., Brinker C.J. 2004. Unusual hydrocarbon chain packing mode and modification of crystalline growth habit in the self-assembled nanocomposites zinc-aluminum -hydroxide oleate and elaidate (cis- and trans- [Zn<sub>2</sub>Al(OH)<sub>6</sub>(CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>COO-)] and magnesium analogues. *Chemistry Materials*. 16, 2750-2756.
- Xu Z.P., Jin Y., Liu S., Hao Z.P., Lu G.Q. 2008. Surface charging of layered double hydroxides during dynamic interactions of anions at the interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 326, 522-529.
- Xu Z.P. y Braterman P.S. 2010. Synthesis, structure and morphology of organic layered double hydroxide (LDH) hybrids: comparison between aliphatic anions and their oxygenated analogs. *Applied Clays Science*. 48, 235-242.
- Yen J-H., Sheu W-S., Wang Y-S. 2003. Dissipation of the herbicide oxyfluorfen in subtropical soils and its potential to contaminate groundwater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54, 151-156.

- You Y., Zhao H., Vance G. F. 2002. Surfactant-enhanced adsorption of organic compounds by layered double hydroxides. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 205, 3, 161-172.
- Zhao H., Jaynes W.F., Vance G.F. 1996. Sorption of the ionisable organic compound, dicamba (3,6-dichloro-2-methoxy benzoic acid), by organoclays. *Chemosphere*. 33, 2089-2100.
- Zhao H. y Nagy K.L. 2004. Dodecyl sulfate-hydrotalcite nanocomposites for trapping chlorinated organic pollutants in water. *Journal of Colloid and Interface Science*. 274, 613-624.
- Zhang Y., Wang L.Q., Zou L.J., Xue DF. 2010. Crystallization behaviors of hexagonal nanoplatelet MgAl-CO<sub>3</sub> layered double hydroxide. *Journal of Crystal Growth*. 312, 22, 3367-3372.
- Zheng S., Yang Z., Jo D.H., Park Y.H. 2004. Removal of chlorophenols from groundwater by chitosan sorption. *Water Research*. 38, 2315-2322.
- Zhou J.L., Rowland S., Mantoura R.F.C., Braven J. 1994. The formation of humic coatings on mineral particles under simulated estuarine conditions: a mechanistic study. *Water Research*. 28, 571-579.
- Zhou Q., Verney V., Commereuc S., Chin I. J., Leroux F. 2010. Strong interfacial adhesion developed by oleate/layered double hydroxide nanoplatelets dispersed into poly(butylene succinate). *Journal of Colloid and Interface Science*. 349, 127-133.
- Zsolnay A., Baigar E., Jimenez M., Steinweg B., Saccomandi F. 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere*. 38, 1, 45-50.





## **VIII. Publicaciones**







## Montmorillonite–chitosan bionanocomposites as adsorbents of the herbicide clopyralid in aqueous solution and soil/water suspensions

R. Celis\*, M.A. Adelino, M.C. Hermosín, J. Cornejo

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, Apartado 1052, 41080 Sevilla, Spain

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 22 September 2011  
Received in revised form 5 December 2011  
Accepted 25 December 2011  
Available online 9 January 2012

**Keywords:**  
Adsorption  
Chitosan  
Organoclays  
Pesticides  
Pollution

### ABSTRACT

Montmorillonite (SWy-2)–chitosan bionanocomposites (SW-CH) were prepared following different methodologies, characterized, and assayed as adsorbents of the herbicide clopyralid (3,6-dichloropyridine-2-carboxylic acid) in aqueous solution and soil/water suspensions, to assess the potential of the materials to prevent and remediate soil and water contamination by anionic pesticides. The SW-CH bionanocomposites were good adsorbents for the herbicide at pH levels where both the anionic form of the herbicide ( $pK_a = 2.3$ ) and the cationic form of CH ( $pK_a = 6.3$ ) predominated. The performance of the SW-CH bionanocomposites as adsorbents of clopyralid depended on the amount and arrangement of chitosan in the samples. Clopyralid adsorption was rapid and mostly linear up to herbicide concentrations as high as 0.5 mM. High salt concentrations (0.1 M NaCl) promoted desorption of the adsorbed pesticide from SW-CH, strongly suggesting that adsorption of clopyralid occurred primarily through an ion exchange mechanism on positively charged CH sites at the montmorillonite surface. Amendment of an acidic soil (pH = 4.5) with SW-CH at rates of 5% and 10% led to a significant increase in clopyralid adsorption, whereas this effect was negligible when SW-CH was added to an alkaline soil (pH = 8.0), reflecting the absence of positively charged sites in SW-CH at high pH values. Montmorillonite–CH bionanocomposites can be useful as adsorbents for the removal and/or immobilization of anionic pesticides in soil and water under mild acidic conditions.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Clay-based nanocomposites and bionanocomposites have become materials of increasing interest due to their nanosized structural and functional properties. Combination at the nanometric scale of the expansive surface areas, anisotropic shape and reactive surfaces of clays with the functional behavior of organic polymers has been pointed out as an attractive way to develop organic–inorganic nanohybrid materials with properties that are inherent to both types of components [1].

Chitosan [poly- $\beta$ (1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose], that is, the deacetylated product of chitin [poly- $\beta$ (1,4)-2-(acetyl amino)-2-deoxy-D-glucose], is a cationic biopolymer which has recently gained increased attention for the preparation of clay-based bionanocomposites [1–7]. It has been suggested that both the physical and functional properties of chitosan can be improved when it is adsorbed onto clay minerals [1,3,4,8]. Thus, Darder et al. [1] showed that chitosan can be intercalated into Na<sup>+</sup>-saturated montmorillonite providing compact and robust three-dimensional

nanocomposites with interesting functional properties. Chitosan chains formed mono- or bilayer structures within the clay mineral interlayer depending on the relative amount of chitosan with respect to the cationic exchange capacity (CEC) of the clay. Subsequent studies have shown that a number of factors, such as pH and temperature, can affect the extent and mode of chitosan adsorption on montmorillonite [3]. For example, given that the  $pK_a$  of the primary amine groups in the chitosan structure is 6.3, an increase in pH leads to a decrease in the degree of protonation of the biopolymer, which increases the amount adsorbed on montmorillonite [3].

Adsorption of chitosan on montmorillonite, particularly when in excess of the CEC of the clay mineral, results in structures with good adsorption properties for anions because the  $-NH_3^+$  groups not directly involved in the interaction with the clay surfaces can act as anionic exchange sites [1]. Accordingly, montmorillonite–chitosan bionanocomposites have recently been proposed for anion-adsorption related applications, such as the development of potentiometric sensors for anions or the removal of selenate and tannic acid from water [4–6].

Acidic pesticides, which are often in their anionic form at the pH of soil and water environments, display a particularly high risk of ground and surface water contamination, because they are weakly retained by most soil and sediment components [9]. For this reason,

\* Corresponding author. Tel.: +34 954624711; fax: +34 954624002.  
E-mail address: [rcelis@irnase.csic.es](mailto:rcelis@irnase.csic.es) (R. Celis).



the development of pesticide adsorbents to prevent and remediate environmental contamination by anionic pesticides has become an important research goal [10–18]. Clay minerals are good adsorbents for cationic and very polar pesticides [19,20]. However, they usually display limited affinity for anionic pesticides, as a result of repulsions between the anionic pesticide species and the negatively charged clay surfaces [21]. The interaction of organic cations with clay minerals can reduce such repulsions, changing the nature of the clay mineral surfaces from hydrophilic to hydrophobic or, if adsorbed in excess of the CEC of the clay, even producing charge reversal. Thus, modification with organic cations is a potentially useful strategy to enhance the affinity of clay minerals for anionic pesticides [14,17,21–25].

On the basis of their potential affinity for anionic species, in this work we evaluated the ability of montmorillonite–chitosan bionanocomposites to adsorb the anionic herbicide clopyralid (3,6-dichloropyridine-2-carboxylic acid). Montmorillonite–chitosan bionanocomposites were prepared following different methodologies, characterized, and then assayed as adsorbents of clopyralid in aqueous solution and soil/water suspensions. The objective was to determine the factors controlling clopyralid adsorption by the montmorillonite–chitosan systems and to illustrate the potential usefulness of these systems for the removal and/or immobilization of anionic pesticides present in soil and water.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

SWy-2 Wyoming montmorillonite was supplied by the Source Clays Repository of the Clay Minerals Society (Purdue University, Indiana). Sodium-saturated SWy-2 (Na-SWy-2) was prepared by three successive treatments of 10 g of SWy-2 with 200 mL of a 1 M NaCl solution. The resulting homoionic clay was repeatedly washed with deionized water until absence of chloride (negative  $\text{AgNO}_3$  test), lyophilized, and stored at room temperature until used.

Low molecular weight (LMW) and medium molecular weight (MMW) chitosan with a deacetylation degree of ~80% (Fig. 1) were purchased from Sigma-Aldrich (Spain). LMW chitosan (MW = 50,000–190,000 g/mol) contained a number of glucosamine units ranging between 250 and 940, whereas MMW chitosan (MW = 190,000–310,000 g/mol) contained a number of glucosamine units ranging between 940 and 1530.

The herbicide clopyralid used in this study was the pure analytical compound, purity = 99% (Pestanal), supplied by Sigma-Aldrich (Spain). Clopyralid (Fig. 1) is a selective herbicide of the pyridine

carboxylic acid family used for control of broadleaf weeds in a range of crops at 50–200 g/ha. It has  $\text{pK}_a = 2.3$ , MW = 192 g/mol, and water solubility = 1 g/l. at 20 °C [26]. Clopyralid is expected to be in its anionic form at the pH of most soil and water environments.

Two soils with markedly different pH values were selected for the experiments. Soil 1 was a sandy loam forest soil of pH = 4.5 with 56% sand, 33% silt, 11% clay, and 5.5% organic carbon. Soil 2 was an agricultural sandy clay loam soil of pH = 8.0 with 63% sand, 16% silt, 21% clay, and 1.4% organic carbon. The soils were sampled from the top 0–20 cm layer, air-dried, passed through a 2-mm aperture sieve, and stored at 4 °C until used.

### 2.2. Synthesis of montmorillonite–chitosan bionanocomposites

Montmorillonite–chitosan (SW-CH) bionanocomposites were prepared following different procedures based on that previously described by Darder et al. [1]. Detailed information on the reagents and synthesis conditions used for the preparation of each sample is given in Table 1. In all cases, 0.8 g of clay (SWy-2 or Na-SWy-2) was added to 200 mL of an aqueous solution containing 650 mg of chitosan at pH = 5.0. Assuming a deacetylation degree for chitosan of ~80%, 650 mg of chitosan contained about 3 mmol of protonable  $-\text{NH}_2$  groups, which corresponded to 500% of the CEC of 0.8 g of SWy-2 ( $\text{CEC}_{\text{SWy-2}} = 76.4 \text{ cmol}_c/\text{kg}$ ).

For the preparation of the sample SW-CH-1, 650 mg of LMW chitosan was dissolved in 200 mL of an aqueous solution containing 30 mmol of acetic acid, and after the resulting solution was stirred for 4 h, its pH was adjusted to 5.0 by adding ca. 30 mmol of NaOH. Next, 0.8 g of SWy-2 was added to the chitosan solution, and the resulting suspension was shaken for 24 h at 25 °C. The final pH of the clay–chitosan suspension remained 5.0 after the 24 h-equilibration (Table 1). The suspension was centrifuged, washed five times with 200 mL of deionized water, lyophilized, and the solid stored at room temperature until used.

SW-CH-2 and SW-CH-3 bionanocomposites were prepared following a procedure identical to that described for SW-CH-1, except that the temperature of the synthesis was increased to 60 °C for SW-CH-2, and MMW chitosan was used instead of LMW chitosan for SW-CH-3 (Table 1).

The samples SW-CH-4, SW-CH-5, and SW-CH-6 were prepared reducing the amount of acid used to dissolve the biopolymer. While for the preceding samples (SW-CH-1, SW-CH-2, and SW-CH-3) the amount of acetic acid used to dissolve the polysaccharide (30 mmol) corresponded to 1000% of the amount of protonable  $-\text{NH}_2$  groups in 650 mg of chitosan (3 mmol) and the exceeding amount was neutralized with NaOH [1], for samples SW-CH-4,

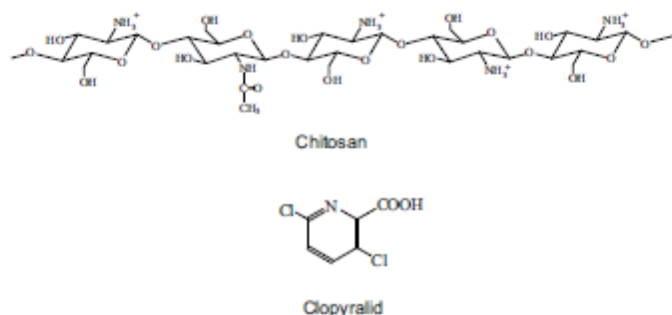


Fig. 1. Molecular structures of chitosan and clopyralid.

**Table 1**  
Nomenclature and synthesis conditions of montmorillonite–chitosan (SW–CH) bionanocomposites.<sup>a</sup>

Nomenclature	Clay (0.8 g)	Chitosan (CH) solution (650 mg CH dissolved in 200 mL aqueous solution)	T (°C)	pH <sub>initial</sub>	pH <sub>final</sub>
SW–CH-1	SWy-2	LMW CH + AcOH (30 mmol) + NaOH (30 mmol)	25	5.0	5.0
SW–CH-2	SWy-2	LMW CH + AcOH (30 mmol) + NaOH (30 mmol)	<b>60</b>	5.0	5.0
SW–CH-3	SWy-2	MMW CH + AcOH (30 mmol) + NaOH (30 mmol)	25	5.0	5.0
SW–CH-4	SWy-2	LMW CH + AcOH (3 mmol)	25	5.0	5.0
SW–CH-5	<b>Na-SWy-2</b>	LMW CH + AcOH (3 mmol)	25	5.0	5.0
SW–CH-6	SWy-2	LMW CH + HCl (0.3 mmol)	25	5.0	7.3

<sup>a</sup> SWy-2: raw SWy-2 Wyoming montmorillonite; Na-SWy-2: Na<sup>+</sup>-saturated SWy-2 sample; LMW CH: low molecular weight chitosan; MMW CH: medium molecular weight chitosan; AcOH: acetic acid; pH<sub>initial</sub>: pH of the initial aqueous CH solution; pH<sub>final</sub>: pH of the clay-solution suspension equilibrated for 24 h. The main difference between the preparation procedure for each sample and that for sample SW–CH-1 is indicated in bold.

SW–CH-5, and SW–CH-6 the amount of acid used corresponded to 100% (SW–CH-4 and SW–CH-5) or only 10% (SW–CH-6) of the amount of –NH<sub>2</sub> groups present in 650 mg of chitosan. Thus, SW–CH-4 and SW–CH-5 were prepared using 3 mmol of acetic acid and were identical to each other except that the latter was prepared using homoionic (Na<sup>+</sup>-saturated) SWy-2 montmorillonite instead of the raw SWy-2 sample. In both cases, the chitosan solution reached pH = 5.0 without the need for subsequent addition of NaOH, and remained 5.0 after the 24 h-equilibration with the clay (Table 1). SW–CH-6 was prepared using 0.3 mmol of HCl and, due to the low amount of acid used to dissolve the biopolymer, was the only sample for which the final pH of the equilibrated clay–chitosan mixture (pH = 7.3) was considerably greater than the pH of the initial chitosan solution (pH = 5.0) (Table 1).

#### 2.3. Synthesis of montmorillonite control samples

To distinguish the effects produced by the association of chitosan with montmorillonite from potential alterations in the clay produced by the specific preparation procedures conducted for the synthesis of the bionanocomposites, three montmorillonite control samples (SW–BL) were also prepared (Table 2). SW–BL-1 was prepared by treating 0.8 g of SWy-2 with 200 mL of a solution containing 30 mmol of acetic acid neutralized to pH = 5.0 by the addition of 30 mmol of NaOH. SW–BL-2 and SW–BL-3 were prepared by treating 0.8 g of SWy-2 with 200 mL of a solution containing 3 mmol of acetic acid or 0.3 mmol of HCl, respectively, without further addition of NaOH. The resulting suspensions were shaken for 24 h, centrifuged, washed five times with 200 mL of deionized water, and then lyophilized.

#### 2.4. Sample characterization

The resulting SW–CH bionanocomposites and montmorillonite control samples were characterized by elemental analysis, X-ray diffraction, scanning electron microscopy, and Fourier-transform infrared spectroscopy. Elemental analyses were performed using a Perkin-Elmer, model 1106, elemental analyzer. X-ray diffraction patterns were obtained on oriented specimens, both air-dried and heated at 200 °C, using a Siemens D-5000 diffractometer with CuK<sub>α</sub> radiation. Scanning electron micrographs were obtained on gold-coated samples using a Hitachi S5200 scanning electron microscope. Fourier-transform infrared (FTIR) spectra were recorded using a Jasco FT/IR 6300 spectrometer (Jasco Europe s.r.l.)

directly placing the solid samples in a horizontal trough attenuated total reflectance (ATR) cell.

#### 2.5. Adsorption–desorption of the herbicide clopyralid on SW–CH bionanocomposites

Clopyralid adsorption–desorption on SW–CH bionanocomposites and montmorillonite control samples was determined by the batch equilibration procedure using glass centrifuge tubes lined with screw caps. Aliquots of 20 mg of adsorbent samples were equilibrated by shaking for 24 h at 20 ± 2 °C with 8 mL of clopyralid initial solutions with herbicide concentrations (C<sub>ini</sub>) ranging between 0.0005 and 0.5 mM. The initial solutions of clopyralid were prepared at pH = 3 (1 mM HCl), since preliminary experiments, conducted under the same experimental conditions but varying the pH of a 0.005 mM initial clopyralid solution between 2.0 and 6.5 indicated that clopyralid adsorption was highest at an initial pH = 3.0. A kinetic experiment was also conducted and revealed that 24 h was sufficient to reach the adsorption equilibrium for clopyralid. After equilibration, the suspensions were centrifuged and 4 mL of the supernatant solutions were removed, filtered and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine the herbicide equilibrium concentration, C<sub>e</sub> (mmol/L). The amount of clopyralid adsorbed, C<sub>s</sub> (mmol/kg), was determined from the difference between the initial and equilibrium solution concentrations. Clopyralid initial solutions without adsorbent were also prepared and served as controls to account for possible losses of herbicide due to processes other than adsorption to the solids. Percentages of clopyralid adsorbed, %Ads, and adsorption distribution coefficients, K<sub>d</sub> (L/kg), at a single initial herbicide concentration of 0.005 mM were calculated as %Ads = [(C<sub>ini</sub> – C<sub>e</sub>)/C<sub>ini</sub>] × 100 and K<sub>d</sub> = C<sub>s</sub>/C<sub>e</sub>, respectively. In addition, adsorption isotherms were fitted to the Freundlich equation: log C<sub>s</sub> = log K<sub>F</sub> + N<sub>F</sub> log C<sub>e</sub>, where C<sub>s</sub> is the amount of clopyralid adsorbed at the equilibrium concentration C<sub>e</sub>, and N<sub>F</sub> (unitless) and K<sub>F</sub> (mmol<sup>1–N<sub>F</sub></sup> L<sup>N<sub>F</sub></sup> kg<sup>–1</sup>) are the empirical Freundlich constants, which can be calculated from the linear plot of log C<sub>s</sub> vs log C<sub>e</sub>.

Desorption experiments were conducted from selected samples immediately after measuring adsorption at C<sub>ini</sub> = 0.01 mM. The 4 mL of supernatant solution removed for the adsorption analysis were replaced with 4 mL of either water or 0.1 M NaCl. The tubes were resuspended, shaken at 20 ± 2 °C for 24 h, centrifuged, and then 4 mL of supernatant were removed, filtered and analyzed

**Table 2**  
Nomenclature and synthesis conditions of montmorillonite control samples without chitosan (SW–BL).<sup>a</sup>

Nomenclature	Clay (0.8 g)	Solution (200 mL aqueous solution)	T (°C)	pH <sub>initial</sub>	pH <sub>final</sub>
SW–BL-1	SWy-2	AcOH (30 mmol) + NaOH (30 mmol)	25	5.0	5.0
SW–BL-2	SWy-2	AcOH (3 mmol)	25	3.4	3.8
SW–BL-3	SWy-2	HCl (0.3 mmol)	25	2.9	6.4

<sup>a</sup> SWy-2: raw SWy-2 Wyoming montmorillonite; AcOH: acetic acid; pH<sub>initial</sub>: pH of the initial 200 mL aqueous solution; pH<sub>final</sub>: pH of the clay-solution suspension equilibrated for 24 h.

**Table 3**  
Results of the elemental analysis of montmorillonite-chitosan (SW-CH) bionanocomposites.

Nomenclature	C (%)	N (%)	Chitosan <sup>a</sup> (%)	Clay <sup>b</sup> (%)	Chitosan <sup>c</sup> (cmol/kg clay)	Saturation degree <sup>d</sup> (%)
SW-CH-1	3.5	0.58	7.0	93.0	36	47
SW-CH-2	3.6	0.60	7.3	92.7	37	48
SW-CH-3	3.3	0.53	6.4	93.6	32	42
SW-CH-4	5.2	0.90	10.9	89.1	58	76
SW-CH-5	7.0	1.20	14.6	85.4	81	106
SW-CH-6	20.1	3.60	43.6	56.4	365	478

<sup>a</sup> Calculated from the N content of the samples.

<sup>b</sup> Calculated as 100 – %Chitosan.

<sup>c</sup> Calculated from the amount of chitosan in the samples assuming full protonation of the –NH<sub>2</sub> groups of the biopolymer.

<sup>d</sup> Percentage of the CEC of the clay compensated by chitosan assuming full protonation of the –NH<sub>2</sub> groups of the biopolymer.

by HPLC. This desorption procedure was repeated three times. All adsorption-desorption experiments were conducted in triplicate.

#### 2.6. Adsorption of clopyralid by bionanocomposite-amended soils

Two bionanocomposites with high affinity for clopyralid (SW-CH-5 and SW-CH-6) were selected as soil amendments to determine their effect on clopyralid adsorption by two soils. For this purpose, triplicate 0.5 g of soil samples were amended with SW-CH-5 or SW-CH-6 at different rates (0%, 5%, and 10%), and then equilibrated by shaking for 24 h at 20 ± 2 °C with 8 mL of a 0.005 mM aqueous solution of clopyralid (pH = 6.5). After equilibration, the suspensions were centrifuged, and 4 mL of the supernatant solution were removed, filtered, and analyzed by HPLC. The amount of clopyralid adsorbed ( $C_a$ ) was determined from the difference between the initial ( $C_m$ ) and equilibrium ( $C_e$ ) herbicide concentrations. Percentages of clopyralid adsorbed (%Ads) and distribution coefficients ( $K_d$ ) were also calculated as described above.

#### 2.7. Herbicide analysis

Clopyralid was analyzed by HPLC using a Waters 1525 chromatograph coupled to a Waters 2996 diode-array detector. The analytical conditions used were: Nova-Pack C18 column (150 mm length × 3.9 mm internal diameter), 91.5/5.0/3.5 water/acetonitrile/acetic acid eluent mixture at a flow rate of 0.7 mL/min, 25 µL injection volume, and UV detection at 280 nm. External calibration curves with standard clopyralid solutions between 0.0005 and 0.01 mM were used in the analyses.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Characterization of the SW-CH bionanocomposites

##### 3.1.1. Elemental analysis

Results of the elemental analysis of the SW-CH bionanocomposites are summarized in Table 3. The amount of chitosan in the samples prepared in the present study ranged between 6.4%, for SW-CH-3, and 43.6%, for SW-CH-6. Considering the deacetylation degree of chitosan as 80% and assuming full protonation of the –NH<sub>2</sub> groups in the biopolymer (Fig. 1), the amount of chitosan present in the samples corresponded to 42–478% of the CEC of the clay (Table 3). The elemental analysis of the montmorillonite control samples, not included in Table 3, revealed C contents < 0.3% and N contents < 0.05% in all cases.

One of the most important factors affecting the amount of chitosan present in the bionanocomposites was the pH of the equilibrated montmorillonite-chitosan suspension (Tables 1 and 3). When the pH of the equilibrated suspension was below the  $pK_a$  of chitosan ( $pK_a = 6.3$ ), the amount of chitosan in the samples rarely exceeded the CEC of the clay (samples SW-CH-1 to SW-CH-5). In fact, for these samples even though chitosan was initially

added in an amount corresponding to 500% of the CEC of the clay, the final amounts of biopolymer were often well below the clay CEC (Table 3). In contrast, when the pH of the equilibrated suspension was above the  $pK_a$  of chitosan (sample SW-CH-6), the amount of chitosan present in the resulting bionanocomposite greatly exceeded the CEC of the clay mineral (Table 3). These results are in accordance with those previously reported by An and Dultz [3], where pH was found to be a decisive factor in the interaction of chitosan with montmorillonite, because an increase in pH leads to a decrease in the degree of protonation of the biopolymer, increasing the amount adsorbed on the clay.

Considering the sample SW-CH-1 as a reference, an increase in temperature (SW-CH-2) and in the MW of the biopolymer (SW-CH-3) both had little effect on the final amount of chitosan in the sample (Table 3). However, reducing the amount of acetic acid used to dissolve the biopolymer from 30 mmol (SW-CH-1) to 3 mmol (SW-CH-4) led to a significant increase in the amount of chitosan in the sample, and this effect was even more pronounced when montmorillonite was previously Na-saturated (SW-CH-5). Given that the pH of the equilibrated suspensions was 5.0 for all these samples (Table 1), we believe that the high amount of NaOH used to neutralize the polysaccharide solution in SW-CH-1, SW-CH-2, and SW-CH-3 (Table 1) could have resulted in competition between cationic chitosan (3 mmol) and Na<sup>+</sup> (30 mmol) for the cation exchange sites on the clay, thus reducing the amount of chitosan adsorbed. Absence of NaOH in the chitosan solution during the preparation of SW-CH-4 and SW-CH-5 reduced competition and favored the exchange reaction. The homoionic, Na-saturated clay (SW-CH-5) resulted in higher amount of chitosan, most likely because Na<sup>+</sup> in Na-SWy-2 was more easy to replace than the mixture of cations (Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>) present in the raw SWy-2 montmorillonite sample [27].

As mentioned above, the only sample where chitosan was present far in excess of the clay CEC was SW-CH-6. This sample was prepared by dissolving chitosan with an amount of HCl (0.3 mmol) corresponding to only 10% of the protonable –NH<sub>2</sub> groups present in the biopolymer (Table 1). Due to the low amount of acid added, the pH of the montmorillonite-chitosan suspension increased up to 7.3 after the 24 h-equilibration (Table 1). Taking into account that the  $pK_a$  of the primary amine groups of chitosan is 6.3, at pH = 7.3 only 10% of such groups are expected to be in their protonated form, thus explaining the high amount of chitosan associated with the clay [3].

##### 3.1.2. X-ray diffraction and scanning electron microscopy

The X-ray diffraction (XRD) patterns of air-dried oriented specimens of SW-CH bionanocomposites and montmorillonite control samples without chitosan are shown in Fig. 2. The X-ray diffractograms of montmorillonite samples without chitosan (Fig. 2b) gave the expected basal spacing ( $d_{001}$ ) of 12.5 Å for the Na-saturated clay (Na-SWy-2), consistent with the presence of interlayer Na<sup>+</sup> retaining one layer of hydration water [28,29],

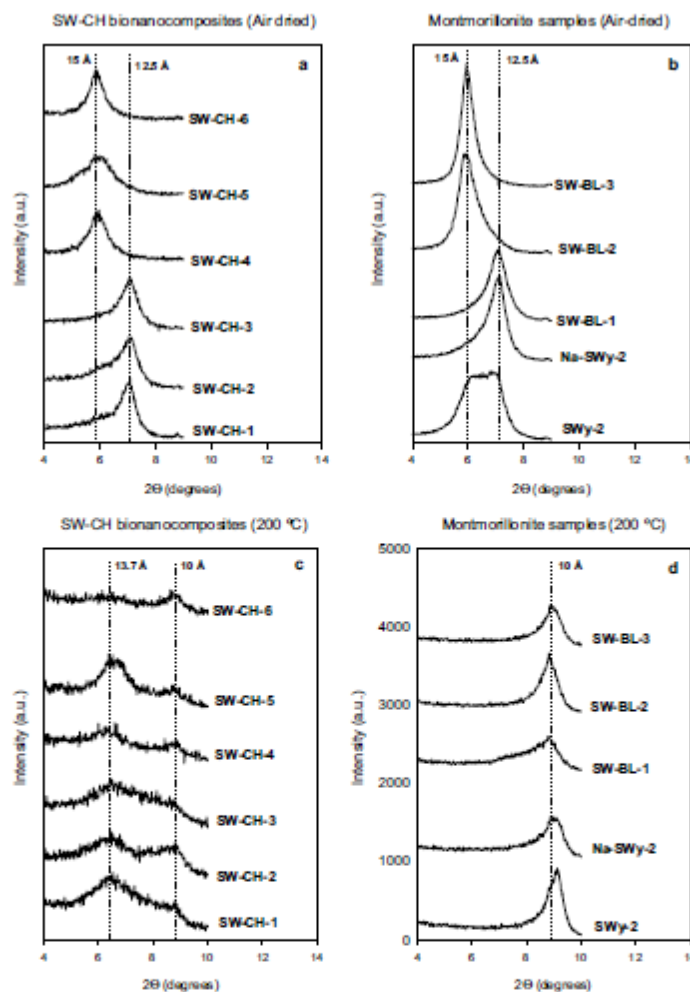


Fig. 2. X-ray diffraction patterns of oriented specimens of SW-CH bionanocomposites and montmorillonite control samples: (a) air-dried SW-CH samples, (b) air-dried montmorillonite samples, (c) SW-CH samples heated at 200 °C, (d) montmorillonite samples heated at 200 °C.

while the presence of different interlayer exchangeable cations (mainly  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$ ) in the raw SWy-2 clay resulted in a poorly defined basal diffraction between 12 and 15 Å (Fig. 2b). SW-BL samples gave basal diffractions of either 12.5 Å, for the sample treated with high acetic acid and NaOH concentrations (SW-BL-1), or 15 Å for the samples treated with lower amounts of acid (SW-BL-2 and SW-BL-3). Therefore, the blank treatments influenced the interlayer hydration of the air-dried clay films. For the SW-CH bionanocomposites (Fig. 2a), the basal diffraction at about 15 Å observed in the SW-CH samples with higher amounts of chitosan (SW-CH-4, SW-CH-5, and SW-CH-6) is consistent with previously

reported values for the intercalation of a monolayer of biopolymer within the interlayer space of montmorillonite [1,5,30], although the tailing effect observed for some of the samples (e.g., SW-CH-5) at lower  $2\theta$  angles could be indicative of the presence of some bilayer SW-CH structures [1]. In samples SW-CH-1, SW-CH-2, and SW-CH-3, the basal diffraction at 12.5 Å, due to the presence of Na-saturated montmorillonite layers free of chitosan, predominated and partially obscured the reflections corresponding to chitosan-intercalated montmorillonite layers (Fig. 2a).

Because the similarity between the basal spacing of ~15 Å corresponding to montmorillonite intercalated with one monolayer



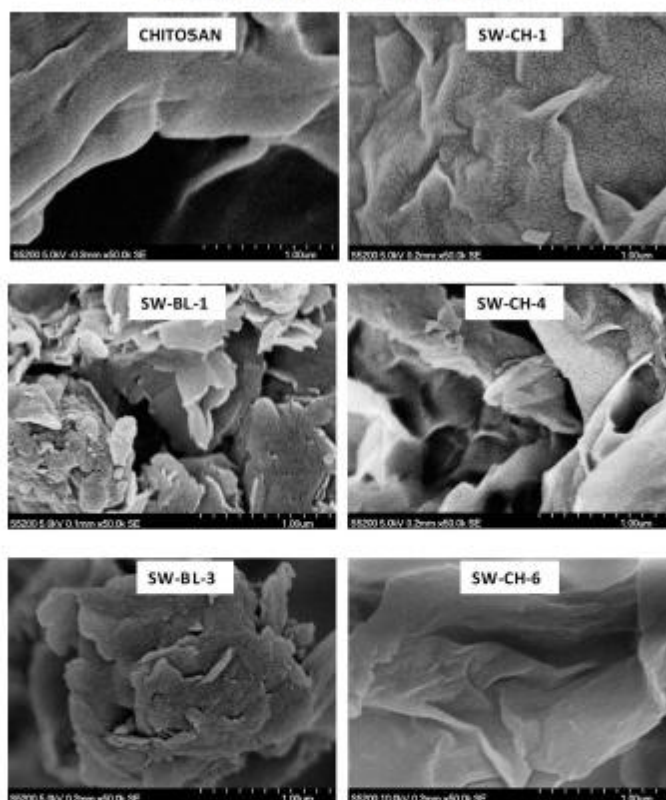


Fig. 3. Scanning electron micrographs of chitosan, montmorillonite control samples (SW-BL) and montmorillonite–chitosan bionanocomposites (SW-CH).

of chitosan and the values corresponding to montmorillonite with interlayer inorganic cations retaining two layers of hydration water, e.g.,  $\text{Ca}^{2+}$ , made the interpretation of XRD patterns of air-dried SW-CH samples difficult, we also obtained the X-ray diffractograms of oriented samples heated at 200 °C (Fig. 2). All montmorillonite samples without chitosan collapsed to a  $d_{001}$  value of 9.6–10 Å upon heating (Fig. 2d), whereas the SW-CH bionanocomposites (Fig. 2c) were resistant to collapse, showing a basal diffraction of 13.7 Å. This value corresponds to a clearance space of about 4 Å between the clay sheets, which concords with the presence of a monolayer of chitosan in the dehydrated interlayer region, thus providing strong evidence for the presence of chitosan in the interlayers of montmorillonite. The residual diffraction near 10 Å that can be identified in most SW-CH samples indicated the presence of some unexchanged layers occupied exclusively by inorganic cations and/or illite impurities. The diffraction at 13.7 Å of heated SW-CH samples were, in general, poorly defined, indicating poorly ordered systems or partial intercalation of the polycation, some of which could have remained at the outer surface of the clay. This was particularly evident for the sample SW-CH-6, where the high amount of chitosan (Table 3) most likely resulted in a significant amount of biopolymer at the external clay

platelets and in a highly disordered structure upon sample heating, both contributing to the poor definition of the 13.7 Å-diffraction.

Analysis of the bionanocomposites by scanning electron microscopy (SEM) was conducted to get further insight into the sample morphology (Fig. 3). Scanning electron micrographs showed that the presence of chitosan rendered lamellar structures where the clay particles appeared to be enveloped in a biopolymer network (Fig. 3). The final morphology depended on the amount of chitosan, so that as the chitosan content increased from SW-CH-1 to SW-CH-6, the lamellar structures displayed greater definition and size. Compared to SW-CH-1, the sample SW-CH-4 showed a more open structure probably resulting from the presence of chitosan both at internal and external clay surfaces. In SW-CH-6, accumulation of chitosan at the external clay surfaces rendered large lamellae closely resembling the morphology of pure chitosan (Fig. 3).

### 3.1.3. Fourier-transform infrared spectroscopy

Fig. 4 shows the FT-IR spectra of LMW chitosan, SWy-2 and the SW-CH bionanocomposites containing the highest amounts of biopolymer (SW-CH-4, SW-CH-5, and SW-CH-6). Band assignments were carried out according to Bellamy [31],

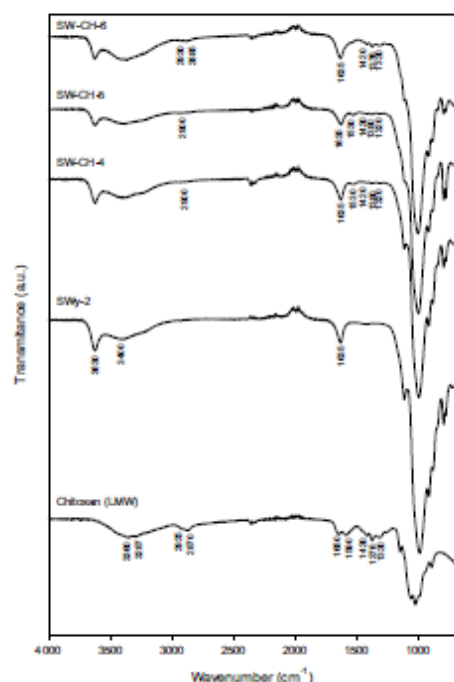


Fig. 4. Fourier-transform infrared spectra of chitosan (LMW), SWy-2 montmorillonite, and selected SW-CH bionanocomposites.

and were in agreement with results previously reported for chitosan–montmorillonite bionanocomposite samples [1,7,32].

In the FT-IR spectrum of pure chitosan, the bands near  $3300\text{ cm}^{-1}$  correspond to stretching vibrations of the O–H and N–H groups of the biopolymer, whereas those near  $2900\text{ cm}^{-1}$  correspond to aliphatic C–H stretching vibrations. In addition, the chitosan C=O stretching (amide I) and N–H deformation vibrations appear, respectively, at  $1650\text{ cm}^{-1}$  and  $1590\text{ cm}^{-1}$ , and the bands near  $1400\text{ cm}^{-1}$  can be attributed to deformation vibrations

of aliphatic C–H groups. In the FT-IR spectrum of SWy-2, the characteristic bands due to structural hydroxyls ( $\nu_{\text{OH}}$  at  $3630\text{ cm}^{-1}$ ), hydration water ( $\nu_{\text{OH}}$  at  $3400\text{ cm}^{-1}$  and  $\delta_{\text{OH}}$  at  $1653\text{ cm}^{-1}$ ), and structural Si–O ( $\nu_{\text{SiO}}$  near  $1000\text{ cm}^{-1}$ ) were identified.

The spectra of SW-CH samples showed the combination of characteristic bands due to chitosan and SWy-2 (Fig. 4). The shifting of the N–H deformation band from  $1590\text{ cm}^{-1}$  in pure chitosan to  $1530\text{ cm}^{-1}$  in SW-CH-4 and SW-CH-5 indicated interaction of the negatively charged montmorillonite surfaces with the protonated amine groups ( $-\text{NH}_3^+$ ) of chitosan [1,32]. Interestingly, this effect was much less evident for the sample SW-CH-6, where according to XRD and SEM results much of the chitosan remained at the external clay surfaces. In this sample only a small fraction of the  $-\text{NH}_2$  groups of chitosan were expected to be in their protonated form, which should have reduced the intensity of the bands corresponding to the  $-\text{NH}_3^+$  groups interacting with the clay. Also in SW-CH-6, the intensity of the bands at  $3400$  and  $1635\text{ cm}^{-1}$  indicated a relatively high water content, suggesting that replacement of the original interlayer inorganic cations of the clay and their hydration water with chitosan chains occurred to a very limited extent. In SW-CH-4 and SW-CH-5, the bands corresponding to the C–H deformation modes of chitosan, particularly that at  $1376\text{ cm}^{-1}$ , were also shifted upon interaction of the biopolymer with the clay mineral layers (Fig. 4).

### 3.2. Adsorption–desorption of clopyralid on SW-CH bionanocomposites

A preliminary experiment was conducted to assess the effect of pH and equilibration time on clopyralid adsorption by SW-CH-1 (Fig. 5). In contrast to the negligible adsorption of clopyralid by all SWy-2 montmorillonite control samples without chitosan (not shown), the SW-CH bionanocomposite (SW-CH-1) was found to be a good adsorbent for the herbicide, but only in the range of pH where both the anionic form of the herbicide ( $\text{pK}_a = 2.1$ ) and the cationic form of chitosan ( $\text{pK}_a = 6.3$ ) predominated. This result strongly indicates that adsorption of the herbicide clopyralid is governed by the presence of positively charged sites at the SW-CH-1 surfaces where, as suggested for other anionic species [4–6,33,34], clopyralid anions can be adsorbed by an anionic exchange mechanism. At low pH levels (e.g.,  $\text{pH} < 2$ ), the positive charge of chitosan is expected to be high but predominance of the neutral form of clopyralid results in little adsorption of the herbicide on SW-CH-1 (Fig. 5a). At high pH levels (e.g.,  $\text{pH} > 5.5$ ), the anionic form of clopyralid predominates but the positively charged adsorption sites on SW-CH-1 for clopyralid anions are expected to decrease rapidly. It is interesting to note that even though chitosan was present in SW-CH-1 in an amount corresponding to only 47%

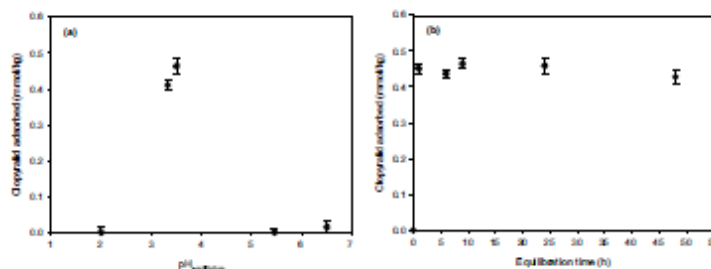


Fig. 5. Effect of pH (a) and equilibration time (b) on clopyralid adsorption by SW-CH-1. The initial concentration of clopyralid in the experiments was  $0.005\text{ mM}$ . The pH of the initial clopyralid solution in (b) was 3.0.

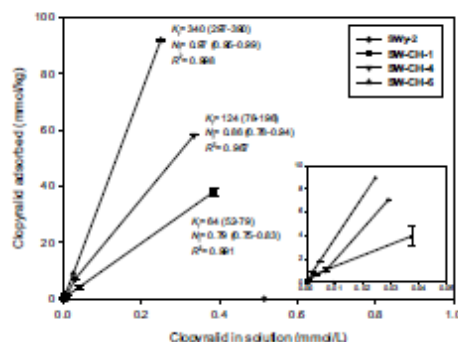


Fig. 6. Clopyralid adsorption isotherms (pH = 3) on SWy-2 and selected SW-CH samples. Adsorption coefficients resulting from fitting the adsorption isotherms to the Freundlich equation are also given. Values in parenthesis correspond to standard errors for the calculated coefficients.

of the CEC of the clay (Table 3), SW-CH-1 appeared to contain some  $\text{-NH}_3^+$  groups with anionic exchange properties, presumably because they were not directly involved in the interaction with the negatively charged clay mineral surface [1]. According to the adsorption results obtained at different pH levels, the subsequent adsorption experiments were conducted at an initial pH = 3. At this pH, clopyralid adsorption kinetics showed that the adsorption of the pesticide on SW-CH-1 was very fast (Fig. 5b), so that 24 h was assumed to be sufficient to reach the adsorption equilibrium for clopyralid on SW-CH bionanocomposites.

Table 4 shows the coefficients for clopyralid adsorption on the SW-CH samples prepared in this work, obtained at a single initial herbicide concentration of 0.005 mM, and Fig. 6 shows clopyralid adsorption isotherms on selected samples in the range of initial herbicide concentrations 0.0005–0.5 mM. In general, clopyralid adsorption was higher for samples with higher amounts of chitosan (Table 4 and Fig. 6), although the variability of the adsorption distribution coefficients normalized to the chitosan content of the samples,  $K_d/\text{chit}$  (Table 4), indicated additional factors, such as the equilibrium pH or the accessibility of adsorption sites in the samples, may have also been important in the final amount of clopyralid adsorbed. For example, adsorption of clopyralid on SW-CH-2, which was prepared at 60 °C, was significantly higher than that on SW-CH-1, prepared at 25 °C, even though the final amount

of chitosan in both samples was very similar (Tables 3 and 4). Apparently, increasing the temperature for the synthesis of the bionanocomposite did not greatly affect the amount of intercalated chitosan, but could have resulted in a different arrangement of the biopolymer, leading to a structure with enhanced availability of clopyralid adsorption sites. Similarly, for SW-CH-4, SW-CH-5, and SW-CH-6, the adsorption coefficients normalized to the chitosan content of each bionanocomposite,  $K_d/\text{chit}$ , decreased with the amount of biopolymer in the sample (Table 4). As observed for other organo-clay complexes [22], clogging of the interlayer space and/or a reduction in the amount of surface exposed for herbicide adsorption in samples with large chitosan loadings could have reduced the effectiveness of the biopolymer in these samples to adsorb clopyralid. The morphology of the samples, with SW-CH-4 displaying greater porosity and exposed surface compared to SW-CH-6 (Fig. 3), supported the latter assumption.

Adsorption isotherms revealed that clopyralid adsorption by SW-CH samples was mostly linear up to herbicide concentrations as high as 0.5 mM (Fig. 6). Adsorption constants resulting from fitting the adsorption isotherms to the Freundlich equation are included in Fig. 6. The Freundlich  $K_f$  values for SW-CH-1, SW-CH-4, and SW-CH-6 (Fig. 6) were somewhat lower than the corresponding  $K_d$  values obtained at a single initial herbicide concentration of 0.005 mM (Table 4), but as  $K_d$  values, they increased with the amount of chitosan in the bionanocomposites. The linearity of the adsorption isotherms, as indicated by the value of  $n_f$  approaching to unity, also increased with the amount of chitosan in the samples. It is also interesting to note that the adsorption coefficients,  $K_d$  and  $K_f$ , given in Table 4 and Fig. 6 are, in general, greater than those previously reported for the adsorption of anionic pesticides such as imazamox, imazethapyr, 2,4-D, or dicamba by Wyoming montmorillonite exchanged with different natural and synthetic organic cations [15,16,18,35]. Apparently, the combination of the layered structures of montmorillonite and chitosan (Fig. 3) resulted in bionanocomposite morphologies which favored the availability and efficiency of the organic moiety and its  $\text{-NH}_3^+$  groups for pesticide adsorption.

Fig. 7 shows the desorption behavior of clopyralid from SW-CH-4 and SW-CH-6. Clopyralid desorption with water occurred slowly, particularly from the highly adsorptive bionanocomposite SW-CH-6, where the pesticide seemed to have remained in adsorption sites less accessible for water molecules and hence more resistant to desorption compared to SW-CH-4. In contrast, high salt concentrations (0.1 M NaCl) promoted rapid desorption of the pesticide from both SW-CH-4 and SW-CH-6. This indicated strong competition between herbicide anions and  $\text{Cl}^-$  for adsorption sites and supported that adsorption of clopyralid occurred primarily through

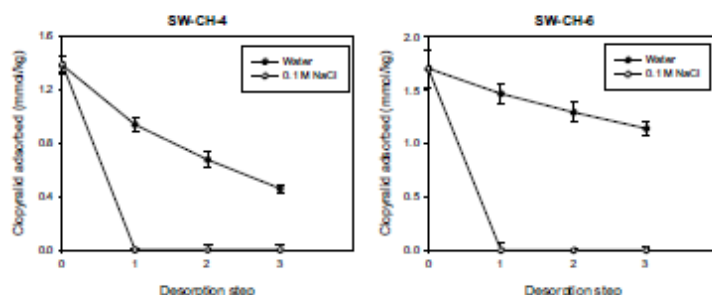


Fig. 7. Clopyralid desorption from SW-CH-4 and SW-CH-6 using water and 0.1 M NaCl.



**Table 4**  
Clopyralid adsorption coefficients on SW–CH bionanocomposites.<sup>a</sup>

Sample	pH <sub>initial</sub>	pH <sub>equilibrium</sub>	%Ads <sup>b</sup>	K <sub>d</sub> <sup>c</sup> (L/kg)	K <sub>d, chit</sub> <sup>d</sup> (L/kg)
SW–CH-1	3.0	3.3	15 ± 1 <sup>e</sup>	71 ± 7	1014
SW–CH-2	3.0	3.4	20 ± 1	102 ± 2	1397
SW–CH-3	3.0	3.4	12 ± 1	52 ± 3	812
SW–CH-4	3.0	3.7	39 ± 1	252 ± 14	2312
SW–CH-5	3.0	3.9	36 ± 1	214 ± 5	1466
SW–CH-6	3.0	4.5	55 ± 2	501 ± 37	1149

<sup>a</sup> Adsorption was measured at an initial herbicide concentration 0.005 mM.

<sup>b</sup> %Ads: percentage of herbicide adsorbed.

<sup>c</sup> K<sub>d</sub>: adsorption distribution coefficient.

<sup>d</sup> K<sub>d, chit</sub>: K<sub>d</sub> value normalized to the chitosan content of each sample.

<sup>e</sup> Mean ± standard error.

**Table 5**  
Clopyralid adsorption coefficients on unamended and bionanocomposite-amended soils.<sup>a</sup>

Sample	pH <sub>initial</sub>	pH <sub>equilibrium</sub>	%Ads <sup>b</sup>	K <sub>d, exp</sub> <sup>c</sup> (L/kg)	K <sub>d, calc</sub> <sup>d</sup> (L/kg)
Soil 1	6.5	4.7	5 ± 1 <sup>e</sup>	0.67 ± 0.08	0.67
Soil 1 + SW–CH-5 (5%)	6.5	4.8	10 ± 2	1.72 ± 0.27	11.3
Soil 1 + SW–CH-5 (10%)	6.5	4.9	18 ± 1	3.56 ± 0.09	22.0
Soil 1 + SW–CH-6 (5%)	6.5	5.0	26 ± 1	5.62 ± 0.30	25.7
Soil 1 + SW–CH-6 (10%)	6.5	5.1	38 ± 1	10.02 ± 0.21	50.7
Soil 2	6.5	8.0	<5	<0.5	<1
Soil 2 + SW–CH-5 (5%)	6.5	8.0	<5	<0.5	10.7
Soil 2 + SW–CH-5 (10%)	6.5	8.0	<5	<0.5	21.4
Soil 2 + SW–CH-6 (5%)	6.5	8.1	<5	<0.5	25.0
Soil 2 + SW–CH-6 (10%)	6.5	8.1	<5	<0.5	50.1

<sup>a</sup> Adsorption was measured at an initial herbicide concentration 0.005 mM.

<sup>b</sup> %Ads: percentage of herbicide adsorbed.

<sup>c</sup> K<sub>d, exp</sub>: experimentally measured adsorption distribution coefficient.

<sup>d</sup> K<sub>d, calc</sub>: expected value of K<sub>d</sub> calculated assuming an independent adsorption behavior of the soil and SW–CH in the mixtures.

<sup>e</sup> Mean ± standard error.

a reversible anion exchange mechanism on positively charged chitosan sites at the montmorillonite surface, with ready desorption by formation of the soluble clopyralid salt [36].

### 3.3. Adsorption of clopyralid by bionanocomposite-amended soils

Two bionanocomposites with high affinity for clopyralid (SW–CH-5 and SW–CH-6) were selected as soil amendments to assess the potential of the materials for the immobilization of this pesticide in two different soils. Amendment of an acidic soil (soil 1) with SW–CH-5 and SW–CH-6 at rates of 5% and 10% led to a significant increase in clopyralid adsorption (Table 5), which can be attributed to the prevalence of cationic exchange sites on SW–CH at the pH of the soil/water suspensions (pH ~ 5.0). In contrast, the increase in adsorption was negligible when SW–CH was added to an alkaline soil of pH ~ 8.0 (soil 2), probably reflecting the absence of positively charged sites in SW–CH at such a high pH value [33].

The experimentally measured distribution coefficients, K<sub>d, exp</sub> for clopyralid adsorption on the bionanocomposite-amended soils were compared with the expected values, K<sub>d, calc</sub>, calculated assuming an independent adsorption behavior of the soil and the bionanocomposite in the mixtures (Table 5). Assuming linear adsorption, such expected values can be calculated according to the equation:

$$K_{d, calc} = K_{d, soil} f_{soil} + K_{d, SW-CH} f_{SW-CH} \quad (1)$$

where K<sub>d, soil</sub> and K<sub>d, SW-CH</sub> are the individual distribution coefficients for clopyralid adsorption on soil and bionanocomposite, and f<sub>soil</sub> and f<sub>SW-CH</sub> are the fraction of soil and bionanocomposite in the mixture, respectively [37,38]. It is worthy to note that, although the bionanocomposites led to a remarkable increase in the adsorption of clopyralid by soil 1, the increase was less than expected from the individual adsorption constants and the fraction of soil and bionanocomposite in the mixtures (K<sub>d, exp</sub> < K<sub>d, calc</sub>). This result

revealed that the bionanocomposites were less effective in adsorbing clopyralid in the presence of soil than in the absence of soil, probably because the interaction of soluble soil components with the bionanocomposites resulted in competition for adsorption sites or surface blockage effects which reduced the performance of the bionanocomposite added to the soil in adsorbing clopyralid.

## 4. Conclusions

The interaction of the biopolymer chitosan with montmorillonite resulted in bionanocomposites with the biopolymer distributed between the internal and external surfaces of the clay depending on the bionanocomposite composition and the preparation procedure. All bionanocomposites showed good adsorption properties for the herbicide clopyralid at pH levels where both the anionic form of the herbicide and the cationic form of chitosan predominated. In general, the removal of clopyralid from aqueous solution was greater for bionanocomposites with higher chitosan contents, although the performance of the biopolymer in adsorbing clopyralid seemed to be affected by its arrangement in each specific sample. Clopyralid adsorption by the montmorillonite–chitosan bionanocomposites was rapid, linear, and high salt concentrations (0.1 M NaCl) promoted the desorption of the adsorbed pesticide, strongly indicating that clopyralid adsorption occurred primarily through an ion exchange mechanism on positively charged chitosan sites at the montmorillonite surface. Addition of montmorillonite–chitosan bionanocomposites to soil was effective in increasing the adsorption of clopyralid, provided the pH of the equilibrated soil suspension remained at slightly acidic levels. These results indicated the potential of the assayed bionanocomposites for different environmental applications such as the removal of anionic pesticides from contaminated water or their immobilization in certain soil environments. The reversibility of the adsorption–desorption process indicates



montmorillonite-chitosan bionanocomposites may be potentially useful biocompatible carriers in the design of pesticide formulations directed to reduce the high mobility of anionic pesticides in the environment and, consequently, ground and surface water contamination risks.

#### Acknowledgments

This work has been financed by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN Projects AGL2008-04031-C02-01 and AGL2011-23779) and Junta de Andalucía (JA Project P07-AGR-03077 and Research Group AGR-264), cofinanced with FEDER-FSE funds through the Operative Program 2007–2013. The authors thank G. Facenda and C. Vaquero for technical assistance. M.A. Adelino also thanks the Spanish MICINN for her FPI fellowship.

#### References

- [1] M. Darder, M. Colilla, E. Ruiz-Hitzky, Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite, *Chem. Mater.* 15 (2003) 3774–3780.
- [2] C. Aguzzi, P. Capra, C. Bonferroni, P. Cerro, I. Salcedo, R. Sánchez, C. Caramella, C. Viseras, Chitosan-silicate biocomposites to be used in modified drug release of 5-aminosalicylic acid (5-ASA), *Appl. Clay Sci.* 50 (2010) 106–111.
- [3] J.-H. An, S. Dultz, Polycation adsorption on montmorillonite: pH and T as decisive factors for the kinetics and mode of chitosan adsorption, *Clay Miner.* 42 (2007) 329–339.
- [4] J.-H. An, S. Dultz, Adsorption of tannic acid on chitosan-montmorillonite as a function of pH and surface charge properties, *Appl. Clay Sci.* 36 (2007) 256–264.
- [5] N. Bleiman, Y.G. Mishaev, Selenium removal from drinking water by adsorption to chitosan-clay composites and oxides: batch and column tests, *J. Hazard. Mater.* 183 (2010) 590–595.
- [6] M. Darder, M. Colilla, E. Ruiz-Hitzky, Chitosan-clay nanocomposites: application as electrochemical sensors, *Appl. Clay Sci.* 28 (2005) 199–208.
- [7] E. Günter, D. Pestrelli, C.H. Özlü, D. Altı, N. Güngör, Synthesis and characterization of chitosan-MMT biocomposite systems, *Carbohydr. Polym.* 67 (2007) 358–365.
- [8] L. Wang, A. Wang, Adsorption characteristics of Congo Red onto the chitosan/montmorillonite nanocomposite, *J. Hazard. Mater.* 147 (2007) 979–985.
- [9] R. Celis, M.C. Hermosin, L. Cox, J. Cornejo, Sorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by model particles simulating naturally occurring soil colloids, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 1200–1206.
- [10] V. Addorisio, S. Esposito, F. Sannino, Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5011–5016.
- [11] S.A. Boyd, S. Shabali, J.F. Lee, M.M. Mortland, Pentachlorophenol sorption by organo-clays, *Clays Clay Miner.* 36 (1988) 125–130.
- [12] F. Bruna, R. Celis, I. Pavlovic, C. Barriga, J. Cornejo, M.A. Ulbarri, Layered double hydroxides as adsorbents and carriers of the herbicide (4-chloro-2-methylphenoxy)acetic acid (MCPA): systems Mg-Al, Mg-Fe and Mg-Al-Fe, *J. Hazard. Mater.* 168 (2009) 1476–1481.
- [13] L. Cardoso, J.B. Valim, Study of acids herbicides removal by calcined Mg-Al-CDs-LDH, *J. Phys. Chem. Solids* 67 (2006) 987–993.
- [14] M.J. Carrisoza, M.J. Calderín, M.C. Hermosin, J. Cornejo, Organosmectite as sorbent and carrier of the herbicide bentazone, *Sci. Total Environ.* 247 (2000) 285–293.
- [15] R. Celis, W.C. Koskinen, A.M. Cecchi, G.A. Bresnahan, M.J. Carrisoza, M.A. Ulbarri, I. Pavlovic, M.C. Hermosin, Sorption of the ionizable pesticide imazamox by organo-clays and organohydrotalcites, *J. Environ. Sci. Health Part B* 34 (1999) 929–941.
- [16] M.C. Hermosin, J. Cornejo, Removing 2,4-D from water by organoclays, *Chemosphere* 24 (1992) 1493–1503.
- [17] M.C. Hermosin, J. Cornejo, Binding mechanism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by organoclays, *J. Environ. Qual.* 22 (1993) 325–331.
- [18] H. Zhao, W.F. Jaynes, G.F. Vance, Sorption of the ionizable organic compound, dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid), by organoclays, *Chemosphere* 33 (1996) 2089–2100.
- [19] L. Cox, M.C. Hermosin, R. Celis, J. Cornejo, Sorption of two polar herbicides in soils and soil clays suspensions, *Water Res.* 31 (1997) 1309–1316.
- [20] M.C. Hermosin, J.L. Pérez-Rodríguez, Interaction of chlordimeform with clay minerals, *Clays Clay Miner.* 29 (1981) 143–152.
- [21] G. Lagaly, Pesticide-clay interactions and formulations, *Appl. Clay Sci.* 18 (2001) 205–209.
- [22] J. Cornejo, R. Celis, I. Pavlovic, M.A. Ulbarri, Interactions of pesticides with clays and layered double hydroxides: a review, *Clay Miner.* 43 (2008) 155–175.
- [23] R. Prost, B. Yaron, Use of modified clays for controlling soil environmental quality, *Soil Sci.* 166 (2001) 880–895.
- [24] A. Radian, Y.G. Mishaev, Characterizing and designing polycation-clay nanocomposites as a basis for imazapyr controlled release formulations, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 1511–1516.
- [25] T. Undabeytia, Y.G. Mishaev, S. Nir, B. Papahadjopoulos-Stenberg, B. Rubin, E. Morillo, C. Maqueda, A novel system for reducing leaching from formulations of anionic herbicides: clay-liposomes, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 4475–4480.
- [26] C.R. Worthing, R.J. Hance, *The Pesticide Manual*, British Crop Protection Council, Surrey, UK, 1991.
- [27] B.K.G. Theng, D.J. Greenland, J.P. Quirk, Adsorption of alkylammonium cations by montmorillonite, *Clay Miner.* 7 (1967) 1–17.
- [28] C.T. Johnston, Probing the nanoscale architecture of clay minerals, *Clay Miner.* 45 (2010) 245–279.
- [29] H.-J. Nam, T. Ebina, F. Mizukami, Formability and properties of self-standing clay film by montmorillonite with different interlayer cations, *Colloid Surf. A* 346 (2009) 158–163.
- [30] S. Kittinavarat, P. Karsomwan, N. Jiratumkuk, Chitosan/modified montmorillonite beads and adsorption Reactive Red 120, *Appl. Clay Sci.* 48 (2010) 87–91.
- [31] L.J. Bellamy, *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, vol. 1, 3rd ed., Chapman & Hall, London, 1975.
- [32] P. Monvisade, P. Siriphannon, Chitosan intercalated montmorillonite: preparation, characterization and cationic dye adsorption, *Appl. Clay Sci.* 42 (2009) 427–431.
- [33] V.M. Boddu, K. Alshari, J.L. Talbott, E.D. Smith, R. Haasch, Removal of arsenic (III) and arsenic (V) from aqueous medium using chitosan-coated biosorbent, *Water Res.* 42 (2008) 633–642.
- [34] R. Canigarr, G. Rytwa, Y. Gonen, A. Radian, Y.G. Mishaev, Polymer-clay nanocomposites for the removal of trichlorophenol and trinitrophenol from water, *Appl. Clay Sci.* 40 (2010) 311–316.
- [35] M. Cruz-Guzmán, R. Celis, M.C. Hermosin, W.C. Koskinen, J. Cornejo, Adsorption of pesticides from water by functionalized organobentonites, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 7502–7511.
- [36] S. Zheng, Z. Yang, D.H. Jo, Y.H. Park, Removal of chlorophenols from groundwater by chitosan sorption, *Water Res.* 38 (2004) 2315–2322.
- [37] B. Gámiz, R. Celis, M.C. Hermosin, J. Cornejo, Organoclays as soil amendments to increase the efficacy and reduce the environmental impact of the herbicide fluometuron in agricultural soils, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 7893–7901.
- [38] M.S. Rodríguez-Cruz, M.J. Sánchez-Martín, M.S. Andrade, M. Sánchez-Camuzano, Modification of clay barriers with a cationic surfactant to improve the retention of pesticides in soils, *J. Hazard. Mater.* 139 (2007) 363–372.



## Environmental behavior of the enantiomers of the chiral fungicide metalaxyl in Mediterranean agricultural soils

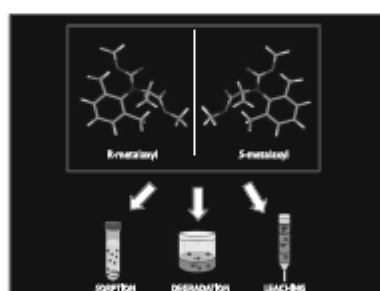
R. Celis\*, B. Gámiz, M.A. Adelino, M.C. Hermosín, J. Cornejo

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, P.O. Box 1052, 41080 Sevilla, Spain

### HIGHLIGHTS

- Enantioselectivity of metalaxyl sorption, degradation, and leaching in soils was studied.
- Metalaxyl sorption by soils and natural and model soil components was non-enantioselective.
- R-metalaxyl displayed faster degradation and reduced leaching than S-metalaxyl.
- The extent of degradation and leaching of metalaxyl enantiomers was soil-dependent.
- Possible factors determining the soil-dependent behavior of metalaxyl enantiomers are discussed.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 September 2012

Received in revised form 30 November 2012

Accepted 30 November 2012

Available online 28 December 2012

#### Keywords:

Chiral pesticides  
Degradation  
Enantioselectivity  
Leaching  
Sorption  
Soil porosity

### ABSTRACT

Improving the existing knowledge on the enantioselectivity of processes affecting chiral pesticide enantiomers in the environment is necessary to maximize the efficacy and minimize the environmental impact caused by the use of pesticides with chiral properties. In this work, the enantioselectivity of the sorption, degradation, and leaching processes of the chiral fungicide metalaxyl in three slightly alkaline, agricultural soils from southern Spain was studied. Batch sorption experiments indicated that the sorption of racemic-metalaxyl on soils, their clay (<2 µm) fractions, and a number of model sorbents simulating naturally-occurring soil colloidal particles was non-enantioselective; the S-enantiomer was sorbed to the same extent as the R-enantiomer on all soil materials. Soil incubation experiments revealed that the R-enantiomer of metalaxyl was degraded faster than the S-enantiomer in all three soils, but the extent and enantioselectivity of metalaxyl degradation was soil-dependent, occurring more slowly and with less enantioselectivity in the fine-textured soil (soil 1) than in the coarse-textured soils (soils 2 and 3). For soils 2 and 3, S- and R-metalaxyl dissipation data were very well described by single first-order kinetics, whereas for soil 1 dissipation data were better fitted by two coupled first-order equations. It is suggested that sorption and entrapment of metalaxyl enantiomers in the abundant small-size pores of soil 1 (i.e., pore radius < 100 nm) could have resulted in a fraction of the fungicide of reduced bioavailability, and consequently, protected from enantioselective degradation. Metalaxyl leaching through soil columns was also enantioselective; the concentration of S-metalaxyl in all leachates collected was greater than

\* Corresponding author at: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, Apartado 1052, 41080 Sevilla, Spain. Tel.: +34 954624711; fax: +34 954624002.

E-mail address: [rcelis@imao.csic.es](mailto:rcelis@imao.csic.es) (R. Celis).

that of *R*-metalaxyl. Despite being non-enantioselective, sorption influenced the enantioselectivity of metalaxyl leaching, as it determined the residence time of the fungicide within the soil column, and consequently, the extent and enantioselectivity of its degradation during leaching.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Factors influencing the enantioselective environmental behavior of chiral pesticides have been pointed out as a current research opportunity in the field of environmental and agricultural chemistry, because some enantioselective environmental processes are not fully understood (Garrison, 2006; Pérez and Barceló, 2008). Although studies on the enantioselective environmental behavior of chiral pesticides first appeared in the early 1990s, they have only recently become a growing area of research. This is because it has become clear that improving the current knowledge about the different efficacy, toxicity, and environmental behavior of chiral pesticide enantiomers is necessary to comply with legislations directed to avoid unacceptable risks to human health and the environment, as well as to address the suitability of replacing pesticide racemic mixtures with single biologically-active enantiomers for a more sustainable pesticide use (Garrison, 2006; Magnan et al., 2002; Ye et al., 2010).

It is well known that the degradation of chiral pesticides in soil is usually enantioselective, primarily due to the enantioselectivity of soil biological degradation processes (Buerge et al., 2006; Garrison et al., 1996; Kurt-Karakus et al., 2005; Li et al., 2006; Ramezani et al., 2010); however, information on factors influencing such enantioselective degradation is still scarce (Buerge et al., 2003; Garrison, 2006; Lewis et al., 1999; Romero et al., 2001; Tan et al., 2008). Enantioselectivity of soil degradation processes can be affected by environmental conditions, such as soil type, pH, and microbial populations, so that agricultural practices affecting those parameters can influence the enantioselective degradation of chiral pesticides (Buerge et al., 2003, 2006; Lewis et al., 1999; Monks et al., 2003; Romero et al., 2001).

The enantioselectivity of the soil sorption process for chiral pesticides is particularly poorly understood. Enantioselective sorption to chiral soil, sediment, or aquatic components could greatly affect the fate of chiral pesticides in the environment (Garrison, 2006), because sorption is a key process determining pesticide bioavailability and hence can affect other transport and transformation processes such as leaching, volatilization or biodegradation (Celis and Koskinen, 1999; Koskinen and Harper, 1990; Oliveira et al., 2001). Even though the ability of certain soil components with chiral crystalline structures (quartz) or chiral surface properties (calcite) to enantioselectively adsorb different chiral compounds was reported long ago (Bonner and Kavasmanek, 1976; Hazen et al., 2001), the enantioselectivity of pesticide sorption in soil is difficult to identify and predict due to the heterogeneity and complexity of organomineral soil colloids and also to the fact that the different enantiomeric morphologies of soil components can be equally abundant (Prondel, 1978; Matallo et al., 1998). Thus, questions remain as to whether soil component assemblages are net “isomer-blind” at the macro-scale or whether inherent selectivity could lead to the homochirality that is evident in biological systems (Wedyan and Preston, 2005). In this regard, many biological structures are chiral and, consequently, are good candidates to display a chiral preference. For example,  $\alpha$ -amino acids forming proteins or  $\alpha$ -ribose and  $\alpha$ -deoxyribose units forming ribonucleic acid (RNA) and deoxyribonucleic acid (DNA) make these soil-occurring structures potential enantioselective adsorbents for chiral pesticides. In accordance with this hypothesis, Wedyan and Preston (2005) presented evidence that an ordinary estuarine sediment exhibited strong optical isomer selectivity in its sorption of a number of amino acids. Similar results were reported by Liu and Lee (2007) and Oravec et al. (2010) for the sorption of different chiral compounds on soil and sediment materials. Enantioselective sorption of chiral pesticides to soil components

would influence the enantiomer bioavailability (Wen et al., 2010), as well as their potential for transport to ground and surface waters (Zipper et al., 1998).

Metalaxyl [methyl-*N*-(2-methoxyacetyl)-*N*-(2,6-xylyl)-DL-alaninate] is a chiral acylamide fungicide widely used in the control of plant diseases caused by pathogens of the *Oomycota* division in several crops. Its fungicidal activity mostly originates from the *R*(-)-enantiomer (Buerge et al., 2003; Chen and Liu, 2009). Previous studies have demonstrated that the degradation of metalaxyl in soil is an enantioselective, microbiologically-mediated process, with *S*-metalaxyl being degraded more rapidly than *R*-metalaxyl in anaerobic soils and in aerobic soils with pH < 4, and *R*-metalaxyl being degraded more rapidly than *S*-metalaxyl in aerobic soils with pH > 5 (Buerge et al., 2003; Buser et al., 2002; Chen and Liu, 2009). However, the factors influencing the enantioselectivity of metalaxyl degradation in soils with similar pH values remain less understood. Furthermore, there is no published data on the enantioselectivity of sorption and leaching processes affecting metalaxyl in soil or on the linkages between these processes, although this information is essential to understand the overall enantioselective behavior of chiral pesticides in the environment. The objectives of this work were: i) to characterize the enantioselectivity of metalaxyl sorption by three slightly alkaline, agricultural soils from Southern Spain with different textures, their clay fractions, and a series of model particles simulating naturally-occurring soil colloids; ii) to determine the enantioselectivity of metalaxyl dissipation in the soils and relate it to the soil characteristics and sorptive properties; and iii) to characterize the enantioselectivity of metalaxyl leaching through soil columns and relate it to metalaxyl sorption and degradation data.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fungicide

High-purity, analytical standard grade, racemic-metalaxyl (chemical purity > 99.5%) purchased from Sigma-Aldrich (Spain) was used in the experiments. Metalaxyl is an acylamide fungicide with molecular mass 279.3 g/mol, water solubility 8.4 g/L (22 °C), and vapor pressure 0.75 mPa (25 °C) (Tomlin, 2006).

### 2.2. Soils, clay fractions, and model sorbents

Three slightly alkaline, Mediterranean agricultural soils from Seville (SW Spain) were used in this study. The soils were selected for having similar pH and organic carbon contents, but different textures and clay mineralogies. The soils were sampled (0–20 cm), air-dried, and sieved to pass a 2 mm mesh before use. The main physicochemical properties of the soils are summarized in Table 1 and are discussed in detail in Gámez et al. (2012).

The clay fraction (< 2  $\mu$ m particle-size fraction) of the soils was separated by sedimentation after carbonate elimination (Jackson, 1975). Elemental analysis of the soil clay fractions was carried out in a Perkin Elmer, model 1106, elemental analyzer (Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT), whereas their phyllosilicate mineralogy was determined by X-ray diffraction analysis on oriented specimens of  $Mg^{2+}$ - and  $K^{+}$ -saturated clay samples, solvated with liquid ethylene glycol and calcined at 550 °C, respectively (Brown, 1961). X-ray diffractograms were obtained in a D-5000 diffractometer (Siemens, Stuttgart) using  $CuK\alpha$  radiation. A detailed discussion of the characteristics of the clay fractions of the soils,



Table 1

Physicochemical properties of the soils used.

Soil	Texture	Sand <sup>a</sup>	Silt <sup>a</sup>	Clay <sup>a</sup>	OC <sup>b</sup>	pH <sup>c</sup>	Hg pore volume <sup>d</sup>	
		(%)	(%)	(%)	(%)		$v_p > 100 \text{ nm}$ (mm <sup>3</sup> /g)	$v_p < 100 \text{ nm}$ (mm <sup>3</sup> /g)
Soil 1	Clay	7	34	59	0.73	7.7	55	55
Soil 2	Sandy loam	73	8	19	0.52	7.7	120	22
Soil 3	Loamy sand	83	7	10	0.54	7.5	150	16

<sup>a</sup> Sand: >0.05 mm; silt: 0.05–0.002 mm; clay: <0.002 mm.

<sup>b</sup> OC: organic carbon content measured by dichromate oxidation.

<sup>c</sup> Measured in 4 g soil; 8 mL water suspension.

<sup>d</sup> Volume of pores with radius ( $r_p$ ) >100 nm and <100 nm measured by mercury intrusion porosimetry ( $r_p$  measurement range: 4–40,000 nm).

which are summarized in Table S1 of the Supplementary material, can also be found in Gámiz et al. (2012).

The model sorbents used in metalaxyl sorption experiments were those used in earlier studies by Cruz-Guzmán et al. (2003) and Celis et al. (2005, 2006), and contained montmorillonite (SW), poorly crystallized ferrihydrite (Ferh), and soil-extracted humic acid (HA). The most relevant characteristics of the model particles are given in the Supplementary material (Table S2). The montmorillonite (SW) was the <2 µm fraction of SWy-2 Wyoming montmorillonite, supplied by the Clay Minerals Repository of the Clay Minerals Society (Purdue University, IN). A SW-Ferh binary association was prepared by neutralizing with 0.1 M NaOH (final pH = 7.5) a suspension containing 500 mL of 30 mM Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and 10 g of SW. The resulting SW-Ferh complex was shaken for 16 h, washed with deionized water, and finally freeze-dried. A SW-Ferh-HA ternary model sorbent was obtained by shaking 10 g of the freeze-dried SW-Ferh binary association in 400 mL of a dissolved HA solution (1 g/L, pH 6.5), then dialyzing against distilled water and freeze-drying (Celis et al., 2005; Cruz-Guzmán et al., 2003).

## 2.3. Sorption experiments

Sorption experiments were conducted by adding 8 mL of an aqueous solution of rac-metalaxyl (1 mg/L) to aliquots of 4 g of soil, 1 g of clay fraction or 0.05 g of model sorbent in glass centrifuge tubes lined with screw caps. The suspensions were equilibrated by shaking in an end-over-end shaker (30 rpm) at 20 ± 2 °C for 24 h. After equilibration, the suspensions were centrifuged at 5000 ×g for 15 min, and 4 mL of the supernatant solution was removed, filtered using glass fiber filters (pore diameter = 0.45 µm), and analyzed by chiral high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine the solution concentration of each metalaxyl enantiomer in the equilibrated suspensions. The amount of S-metalaxyl and R-metalaxyl sorbed on the solids,  $C_s$  (mg/kg), was calculated from the difference between the initial ( $C_{0i}$  = 0.5 mg/L) and equilibrium ( $C_e$ ) solution concentration of each enantiomer. Tubes with the initial rac-metalaxyl solution without sorbent were also shaken for 24 h and revealed no loss of the fungicide due to processes different from sorption to the solids during the sorption experiment. All sorption measurements were conducted in triplicate. Sorption distribution coefficients,  $K_d$  (L/kg), were calculated by dividing the amount of each enantiomer sorbed ( $C_s$ ) by its equilibrium solution concentration ( $C_e$ ). The enantiomer fraction (EF) in the equilibrated solutions during the sorption experiments was calculated according to Harner et al. (2000) as:

$$EF = \frac{C_{e-S(+)}}{C_{e-S(+)} + C_{e-R(-)}} \quad (1)$$

where  $C_{e-S(+)}$  and  $C_{e-R(-)}$  are the equilibrium solution concentrations of the S(+) and R(−) enantiomers of metalaxyl, respectively.

## 2.4. Dissipation experiment

The enantioselective dissipation of metalaxyl in the soils was studied under aerobic conditions by means of an incubation experiment

in which samples of 200 g of soil were spiked with rac-metalaxyl at a rate of 2 mg/kg soil, and then incubated in glass jars at 20 ± 2 °C for 42 days. The soil moisture content was maintained at a constant level close to the water content held by the soil columns used in the leaching experiments after they were saturated with water and allowed to drain for 24 h (see below), i.e., 40% for soil 1, 30% for soil 2, and 25% for soil 3 on a weight basis. Periodically, triplicate 3 g soil aliquots were sampled using a sterilized spatula and immediately frozen until analyzed. The amounts of S- and R-metalaxyl in the 3 g soil aliquots at each sampling time were determined by extraction with 8 mL of methanol (24 h shaking), followed by centrifugation, and enantioselective analysis of the supernatant by chiral HPLC. Preliminary experiments had shown that this extraction procedure recovered >90% of the S- and R-metalaxyl freshly applied to the soils.

At each sampling time, the enantiomer fraction (EF) was calculated by dividing the soil concentration of S(+)–metalaxyl by the sum of the soil concentrations of the S(+)– and R(−)–metalaxyl enantiomers (Harner et al., 2000). In addition, single first-order (Eq. (2)) and double first-order in parallel (Eq. (3)) equations were used to describe S- and R-metalaxyl dissipation data (FOCUS, 2006):

$$C = C_0 e^{-k_1 t} \quad (2)$$

$$C = C_{01} e^{-k_1 t} + C_{02} e^{-k_2 t} \quad (3)$$

where C (mg/kg) is the enantiomer concentration in soil at time t (days). In Eq. (2),  $C_0$  (mg/kg) is the enantiomer concentration in soil at time zero and  $k_1$  (days<sup>−1</sup>) is the single first-order dissipation rate. In Eq. (3),  $C_{01}$  and  $C_{02}$  are the initial enantiomer concentrations in compartments 1 and 2, and  $k_1$  and  $k_2$  their respective dissipation constants. Model fitting was achieved by using nonlinear regression software available with SigmaPlot Version 8.0. Other kinetic equations such as the empirical square root first-order model, which has previously been used to describe metalaxyl dissipation data in the field (Monkiedje et al., 2007), were also tested, but resulted in poor fitting of the experimental data to the model.

## 2.5. Column leaching experiment

Leaching experiments were conducted in 30 cm length × 3.1 cm internal diameter (i.d.) glass columns filled with air-dried soil. Glass wool plus 10 g of sea sand was placed on the bottom of the columns (5 cm) to avoid losses of soil and contamination of leachates with soil particles. Next, the columns were hand-packed with the soil (20 cm), and 10 g of sea sand was placed on the soil surface. The columns were saturated with water, allowed to drain for 24 h, and then 0.15 mg of rac-metalaxyl dissolved in 1 mL of water was applied to the top of the soil columns, to give an application rate of 2 kg/ha. The amount of water held by the columns after saturation and 24 h-drainage (column pore volume,  $V_p$ ) was 64 ± 1 mL for soil 1, 55 ± 2 mL for soil 2, and 57 ± 2 mL for soil 3. Daily, 15 mL of distilled water was applied to the soil columns and the leachates were collected, filtered, and

analyzed by HPLC to determine the *S*- and *R*-metalaxyl enantiomer concentrations.

The position of the maximum concentration peaks of the *S*- and *R*-metalaxyl breakthrough curves (BTCs) was compared with the predicted retardation factor (RF), which was calculated for each soil assuming linear, instantaneous, and reversible sorption conditions using the following equation (Rao et al., 1985):

$$RF = 1 + (\rho/\theta)K_d \quad (4)$$

In Eq. (4),  $\rho$  is the bulk density of the soil column ( $\text{g}/\text{cm}^3$ );  $\theta$  is the soil column volumetric water content ( $\text{cm}^3/\text{cm}^3$ ) and  $K_d$  ( $\text{L}/\text{kg}$ ) is the sorption distribution coefficient for *S*- and *R*-metalaxyl in the soil column. The  $K_d$  values measured in the batch sorption experiments were assumed for the calculation of the RF values using Eq. (4). The RF value represents the number of water pore volumes ( $V_p$ ) at which the maximum concentration of chemical is expected to appear in leachates (Flores-Céspedes et al., 2002).

## 2.6. Enantioselective analysis of metalaxyl

Metalaxyl enantiomers were determined by chiral HPLC using a Waters 600E chromatograph coupled to a Waters 996 diode-array detector. The conditions used were: Chiralpak IB column (150 mm length  $\times$  4.6 mm id., 5  $\mu\text{m}$  particle size), 60:40 water:acetonitrile eluent mixture at a flow rate of 1 mL/min, 50  $\mu\text{L}$  injection volume, and UV detection at 213 nm. External calibration curves with five standard solutions between 0.1 and 6 mg/L of *rac*-metalaxyl were used in the calculations. Under the analytical conditions used, the retention times for the *S*(+)- and *R*(-)-enantiomers of metalaxyl were 4.9 and 6.1 min, respectively, and *rac*-metalaxyl yielded an exact peak area ratio of 1:1 ( $EF = 0.500 \pm 0.003$ ) in both standard solutions and freshly-spiked aqueous and methanolic soil extracts (see Fig. S1 of the Supplementary material). The limit of quantification (LOQ), calculated as the concentration resulting in a signal to noise ratio of 10:1, was 0.02 mg/L for both enantiomers.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Sorption experiments

Table 2 shows the distribution coefficients ( $K_d$ ) measured for the *S*- and *R*-enantiomers of metalaxyl after a 24 h-equilibration of *rac*-metalaxyl with the soils, clay fractions, and model sorbents. The enantiomer fractions (EFs) in solution after the 24 h-equilibration are also included in Table 2. There was no statistical difference in the  $K_d$  values measured for the *S*- and *R*-enantiomers and the EF values remained  $0.50 \pm 0.01$  after the 24 h-equilibration (Table 2), indicating that the sorption of metalaxyl by the soils, clay fractions, and model sorbents was non-enantioselective. Considering the variability

associated with the sorption experiments conducted in this work, our data indicated that, if it occurred, enantioselectivity accounted for less than 5% of the total metalaxyl sorption by the soils, clay fractions, and model sorbents, which made it non-detectable during the sorption experiments. Consequently, in contrast to the strong enantioselectivity reported for the sorption of other chiral compounds on natural materials (Liu and Lee, 2007; Oravec et al., 2010; Wedyan and Preston, 2005), it appeared that the wide variety of soil materials used in this work were either mostly non-enantioselective in their interaction with metalaxyl or at least not “isomer-blind” at the macro-scale with regard to metalaxyl sorption.

The sorption coefficients obtained for *S*- and *R*-metalaxyl on the three Mediterranean soils selected for this study (Table 2) are similar to those obtained in previous non-enantioselective sorption studies of *rac*-metalaxyl on low organic carbon content soils, where the fungicide was analyzed as if it was an achiral single compound (Bermúdez-Couso et al., 2011; Fernandes et al., 2003; Marín-Benito et al., 2009). In such previous studies, organic matter was identified as the most important single soil component affecting the sorption of metalaxyl, but the role of mineral soil constituents was also pointed out and related to the polar character of this fungicide (Fernandes et al., 2003; Marín-Benito et al., 2009). For example, very high sorption of metalaxyl on a clay soil from Southern Spain was attributed to its content in highly sorptive, altered illite (Fernandes et al., 2003). For the three soils used in the present study, which had similar and low organic carbon contents (Table 1), the distribution coefficients measured for *R*- and *S*-metalaxyl at an initial *rac*-metalaxyl concentration of 1 mg/L (Table 2) increased with the clay content of the soils: soil 3 < soil 2 < soil 1 (Table 1) and with the smectite + illite content of the soil clay fractions: soil 2 < soil 3 < soil 1 (Table S1), supporting the importance of clay mineral constituents on the sorption of metalaxyl enantiomers in low organic carbon content soils. In addition, sorption of metalaxyl enantiomers on model sorbents (Table 2) revealed greater sorption on montmorillonite (SW) and montmorillonite-ferrihydrite (SW-FerriH) mineral sorbents than on the ternary sorbent containing humic acid (SW-FerriH-HA). This behavior, which has also been observed for other very polar pesticides and attributed to blockage of the mineral surfaces by the organic material (Celis et al., 1997), further illustrated the importance of mineral soil constituents in the sorption of metalaxyl enantiomers.

### 3.2. Dissipation experiment

The dissipation of *rac*-metalaxyl in the three soils selected for this study was enantioselective, with the *R*-enantiomer being degraded faster than the *S*-enantiomer in the three soils, particularly in soils 2 and 3 (Fig. 1). Accordingly, EF values,  $EF = [S]/([S] + [R])$ , rapidly became  $>0.5$  during the incubation experiment, reaching a value of 0.80 at the end of the experimental period for soils 2 and 3 (Fig. 1). A value of  $EF = 0.80$  represents that as much as 80% of the metalaxyl residues were in the form of *S*-metalaxyl, and only 20% were in the form of *R*-metalaxyl. These data are consistent with those obtained by Buerge et al. (2003) indicating that in aerobic soils with  $\text{pH} > 5$ , the fungicidally active *R*-enantiomer of metalaxyl degraded faster than the *S*-enantiomer, leading to residues with a composition  $[S] > [R]$ . Buerge et al. (2003) indicated that, although the underlying processes are unknown, this result may be rationalized on the predominance of microbial populations or consortia preferentially degrading the *R*-enantiomer at certain pH levels or on the activation/inhibition of enantiomer-specific enzymes depending on pH. Since racemization may have a great influence on enantioselectivity, it is also important to note that previous studies have proven that metalaxyl was configurationally stable in soil, showing no interconversion of *R*- to *S*-enantiomers, and vice-versa (Buerge et al., 2003; Buser et al., 2002).

In general, the dissipation of *S*- and *R*-metalaxyl in the coarse-textured soils (soils 2 and 3) was very well described by single first-order kinetics (Eq. (2)), with coefficients of determination

**Table 2**  
Distribution coefficients ( $K_d$ ) for *S*- and *R*-metalaxyl sorption on soils, clay fractions, and model sorbents and enantiomer fractions (EFs) in the equilibrated solutions.

Soil		$K_d$ ( $\text{L}/\text{kg}$ )		EF
		<i>S</i> -metalaxyl	<i>R</i> -metalaxyl	
Soils	Soil 1	$1.54 \pm 0.01^a$	$1.51 \pm 0.04$	$0.408 \pm 0.003$
	Soil 2	$0.58 \pm 0.02$	$0.59 \pm 0.04$	$0.409 \pm 0.004$
	Soil 3	$0.31 \pm 0.02$	$0.31 \pm 0.02$	$0.501 \pm 0.004$
Clay fractions	Soil 1	$2.48 \pm 0.20$	$2.53 \pm 0.07$	$0.409 \pm 0.002$
	Soil 2	$1.43 \pm 0.06$	$1.54 \pm 0.05$	$0.501 \pm 0.001$
	Soil 3	$1.72 \pm 0.06$	$1.84 \pm 0.02$	$0.501 \pm 0.001$
Model sorbents	SW	$81.0 \pm 0.5$	$70.9 \pm 1.3$	$0.500 \pm 0.001$
	SW-FerriH	$94.1 \pm 0.5$	$94.4 \pm 4.1$	$0.502 \pm 0.004$
	SW-FerriH-HA	$67.2 \pm 4.8$	$66.6 \pm 3.3$	$0.501 \pm 0.000$

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  standard error.

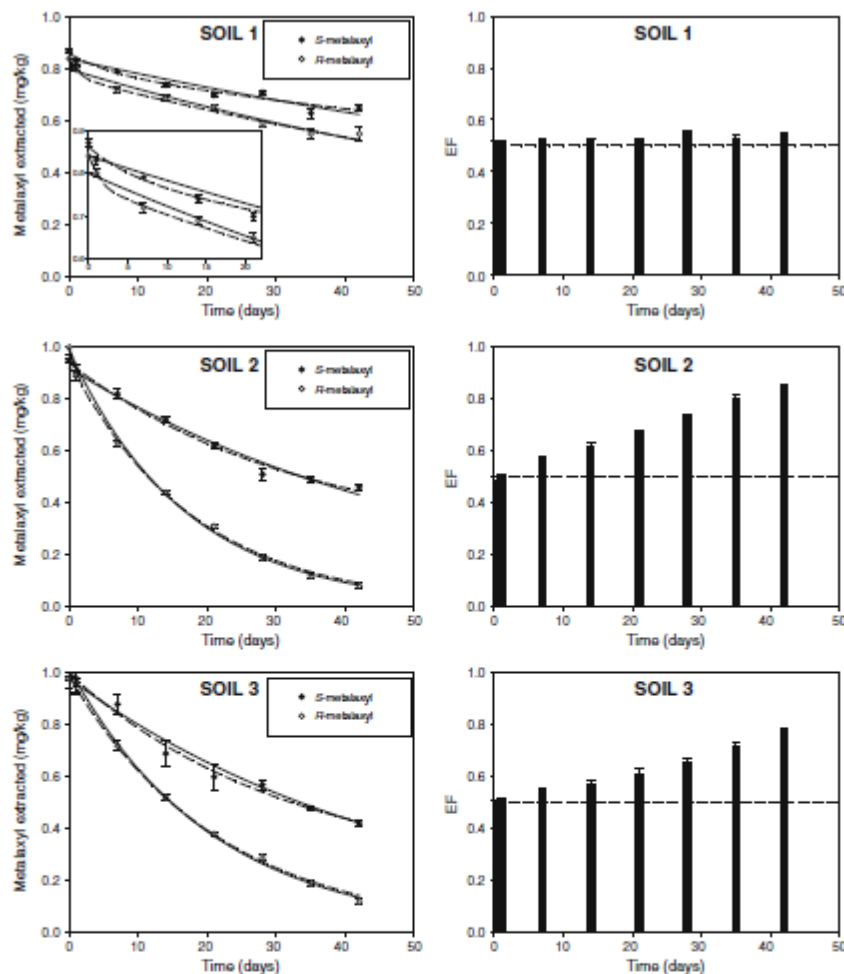


Fig. 1. S- and R-metolaxyl dissipation curves and change in the enantiomer fraction (EF) with time during the incubation experiment of *rac*-metolaxyl in soils. In the dissipation curves, symbols represent experimental data, whereas lines correspond to the fittings to single (solid) and bi-exponential (dashed) first-order dissipation kinetics. Error bars correspond to standard errors of triplicate measurements. The insert in the graph for soil 1 shows the same data at a different scale.

$R^2=0.98-1.00$  (Table 3, Fig. 1). The first-order half-lives ( $t_{1/2}=0.693/k$ ) obtained for S- and R-metolaxyl in soils 2 and 3 (Table 3) were in the range of those reported by Buerge et al. (2003) for aerobic surface soils with pH values of 6.4–7.1, that is, close to the pH values of the soils used in the present study (Table 1). However, the clay soil used in this work (soil 1) had a markedly different behavior, yielding considerably greater half-lives, less enantioselectivity, and a poorer fitting of the experimental dissipation data to single first-order kinetics ( $R^2=0.92-0.96$ ) compared to soils 2 and 3 (Fig. 1, Table 3).

Fitting of the dissipation data to a two-compartment, bi-exponential model (Eq. (3)) was also tested. A visual assessment of the goodness of

the fits indicated that while the two-compartment model was not strongly superior to the single first-order equation in describing the dissipation of metolaxyl enantiomers in soils 2 and 3, it provided a better fit than did the simple first-order equation for soil 1, particularly at shorter incubation times (Fig. 1). Since the determination coefficient  $R^2$  has a limited value when comparing the fits of two models with different numbers of parameters, the chi-square ( $\chi^2$ ) error value test recommended by the FOCUS degradation kinetics guidance was used for model comparison (FOCUS, 2006). Only for soil 1, the two-compartment model resulted in smaller  $\chi^2$  minimum error value (at which the test is passed at the 5% significance level)

**Table 3**  
Single first-order dissipation constants for S- and R-met alaxyl in soils.

		$k$ ( $d^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (d)	$R^2$	$\chi^2$ error (%)
Soil 1	S-met alaxyl	$0.007 \pm 0.001^a$	$99 \pm 13$	$0.92 (0.96)^b$	$2.3 (2.1)^b$
	R-met alaxyl	$0.010 \pm 0.001$	$68 \pm 7$	$0.96 (0.99)$	$2.4 (1.5)$
Soil 2	S-met alaxyl	$0.018 \pm 0.001$	$39 \pm 2$	$0.98 (0.99)$	$2.6 (2.6)$
	R-met alaxyl	$0.059 \pm 0.001$	$12 \pm 1$	$1.00 (1.00)$	$2.8 (2.0)$
Soil 3	S-met alaxyl	$0.020 \pm 0.001$	$35 \pm 2$	$0.99 (0.99)$	$2.8 (3.0)$
	R-met alaxyl	$0.048 \pm 0.002$	$14 \pm 1$	$1.00 (1.00)$	$1.7 (2.0)$

<sup>a</sup> Value  $\pm$  standard error.

<sup>b</sup> For comparison purposes, the coefficients of determination ( $R^2$ ) and  $\chi^2$  minimum error values at which the  $\chi^2$  test is passed at the 5% significance level ( $\chi^2$  error) for the fits to a two-compartment, bi-exponential model (Eq. (3)) are given in parentheses.

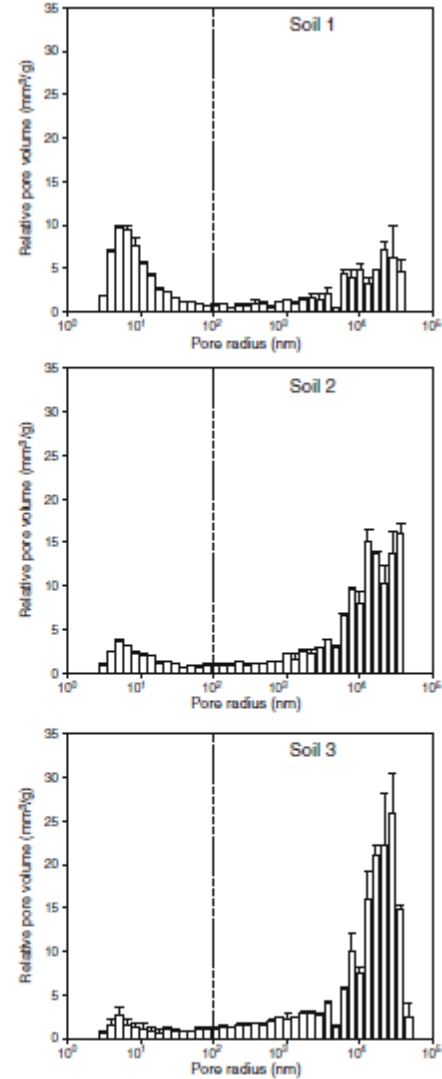
than the single first-order model for both enantiomers (Table 3). The two bi-exponential equations describing the dissipation of S- and R-met alaxyl in soil 1 were:

$$S\text{-met alaxyl: } C = 0.07 \cdot e^{-0.105t} + 0.79 \cdot e^{-0.005t} \quad (5)$$

$$R\text{-met alaxyl: } C = 0.07 \cdot e^{-0.005t} + 0.77 \cdot e^{-0.005t} \quad (6)$$

The superior fitting of met alaxyl dissipation data to the two-compartment model for the clay soil (soil 1) suggests that a fraction of the added pesticide in this soil could have displayed reduced bio-availability, thus dissipating at a relatively slower degradation rate, than the more available fraction typically present in the accessible soil solution phase (Beulke and Brown, 2001). This behavior would also contributed to explain the reduced enantioselectivity of met alaxyl degradation in soil 1, because the protected, less bioavailable fraction is expected to be more racemic than the fraction readily available to enantioselective biodegradation, since it is supposed to have undergone less microbial attack (Ulrich et al., 2009; Wong et al., 2012).

A possible explanation for the soil-dependent dissipation pattern of met alaxyl enantiomers in the three soils selected for this study could be the variability in the amount and activities of specific microbial species taking part in the degradation of the pesticide molecule (Banerjee et al., 2006). Degradation is slower in the clay soil than in the other soils, so that the difference between the two enantiomers is expected to be less pronounced. However, the performance of the two-compartment model to describe the dissipation of met alaxyl enantiomers in the clay soil strongly suggests that differences in the physicochemical properties of the soils could have also played an important role. In particular, the differences in pore-size distribution between the clay soil (soil 1) and the coarse-textured soils (soils 2 and 3) should be noted (Fig. 2), since it is well known that sorption and entrapment in small-size pores is a major mechanism making organic chemicals unavailable to soil microorganisms and protecting them from biodegradation (Barriuso et al., 1997; Pignatello and Xing, 1996). For example, as the diameters of the smallest bacteria in soils, sediments, and rocks are considered to be larger than 200 nm, they cannot directly access the organic contaminants entrapped or sorbed in these tiny pores (Cheng et al., 2012). In this regard, mercury intrusion porosimetry measurements showed that while only 9–15% of the total porosity of soils 2 and 3 corresponded to pores with a pore radius  $r_p < 100$  nm, 50% of the total porosity of soil 1 corresponded to such small pores (Table 1). Pores with  $r_p$  around 10 nm were particularly abundant in soil 1 (Fig. 2), and the high smectite + illite content of this soil (Table S1) should have provided the soil with additional clay interlayer space upon swelling of the clay minerals in contact with water (Nagpal et al., 1972). Therefore, sorption and entrapment in the abundant small-size pores of soil 1 are likely to have reduced the availability of met alaxyl enantiomers for microbial degradation, and also to have



**Fig. 2.** Relative pore-size distributions of the soils determined by mercury intrusion porosimetry. Error bars correspond to the standard error of triplicate measurements. The vertical dashed line indicates the size limit accessible to the smallest microorganisms according to Cheng et al. (2012).

reduced the enantioselectivity of the met alaxyl degradation process, the latter because the less bioavailable pesticide fraction is supposed to remain racemic longer than the readily biodegradable fraction (Ulrich et al., 2009; Wong et al., 2012).



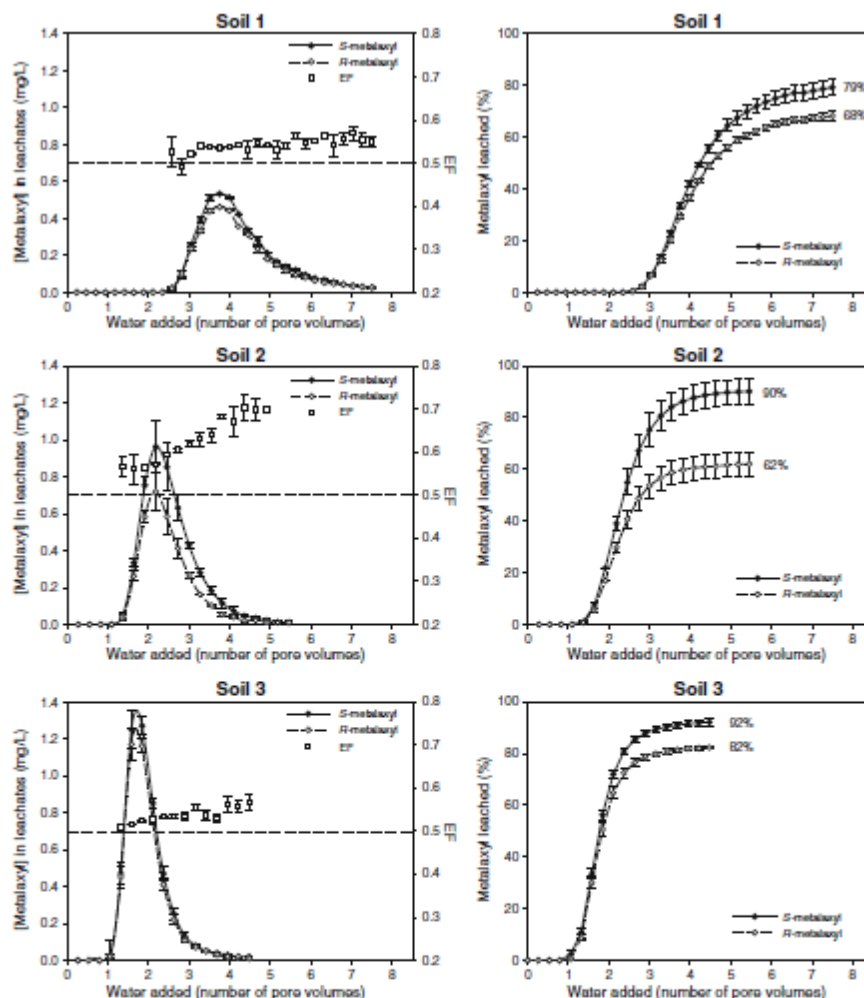


Fig. 3. Relative and cumulative breakthrough curves (BTCs) for S- and R-metalaxyl enantiomers in hand-packed soil columns. Enantiomer fractions (EF) in the leachates are also indicated in the relative BTCs. Error bars correspond to standard errors of triplicate measurements.

It is also interesting to note that, using the batch sorption distribution coefficients measured for S- and R-metalaxyl on the three soils (Table 2), it can be calculated that under the experimental conditions of the incubation experiment, the total amount of metalaxyl sorbed, i.e. associated with the soil's solid phase, would represent about 80% of the added fungicide in soil 1, 65% in soil 2, and 55% in soil 3. The fact that the enantioselectivity of degradation was smaller in the soil with the largest  $K_d$  value suggests that the strength of sorption may have influenced the racemic nature. Furthermore, most of the extensive sorption of metalaxyl in soil 1 should have occurred in the abundant small-size pores present in this soil, resulting in a

large portion of low-availability pesticide fraction. This large amount of less available fraction is also predicted by the large  $C_{0.02}$  coefficients obtained for the two bi-exponential equations describing the dissipation of S- and R-metalaxyl enantiomers in soil 1 (Eqs. (5) and (6)).

The main assumptions of the bi-exponential model used to fit metalaxyl dissipation data in soil 1 are that a fraction of the added pesticide is placed immediately into a compartment with reduced bioavailability, when it comes into contact with the soil, and that in this compartment degradation occurs slowly. Thus, the bi-exponential model uses an empirical simplified concept to match a bi-phasic dissipation behavior which is not likely to occur in reality, because sorption



**Table 4**  
Summary of S- and R-metolaxyl column leaching data extracted from the relative and cumulative breakthrough curves (BTCs).<sup>a</sup>

Soil		$C_{max}$ (mg/L)	Position of $C_{max}$ (mL) ( $\times V_p$ )		RF	Total leached (%)
Soil 1	S-metolaxyl	0.53	240	3.7	4.8	79
	R-metolaxyl	0.46	240	3.7	4.8	68
Soil 2	S-metolaxyl	0.96	120	2.2	2.7	90
	R-metolaxyl	0.72	120	2.2	2.7	62
Soil 3	S-metolaxyl	1.27	98	1.7	2.0	92
	R-metolaxyl	1.17	98	1.7	2.0	82

<sup>a</sup>  $C_{max}$ : maximum concentration of S- and R-metolaxyl in leachates; position of  $C_{max}$ : mL or number of porevolumes ( $V_p$ ) of water added at which  $C_{max}$  appeared in leachates; RF: expected retardation factor for S- and R-metolaxyl calculated using Eq. (4); total leached: total amount of S- and R-metolaxyl recovered in leachates.

and entrapment are time-dependent processes which occur slowly. Sorption gradually increases over time as the pesticide moves from the available to the less available state via diffusion (Pignatello and Xing, 1996). Nevertheless, although the fit to the two-compartment model cannot be used as a direct evidence for entrapment, it suggests the presence of an important pesticide fraction with reduced bioavailability in the clay soil. It has recently been observed that chiral organochlorine pesticides in sequestered and bioavailable soil compartments, which were differentiated by means of chemical extraction methods, were subjected to different degrees of enantioselective degradation (Wong et al., 2012).

### 3.3. Leaching experiment

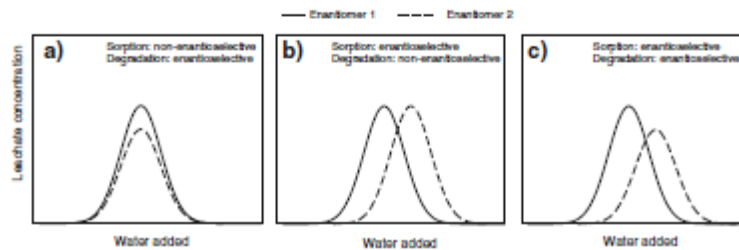
Relative and cumulative breakthrough curves (BTCs) for S- and R-metolaxyl applied to soil columns as a racemic mixture are shown in Fig. 3. The enantiomer fractions (EFs) in the leachates collected during the column experiment are also included in the relative BTC graphs. For all three soils, relative BTCs show that the S- and R-enantiomers of metolaxyl were similarly retarded in the soil columns, that is, the maximum concentration of both enantiomers appeared in leachates after applying a similar amount of water of 240 mL for soil 1, 120 mL for soil 2, and 98 mL for soil 3, which corresponded to 3.7, 2.2, and 1.7 times the pore volume ( $V_p$ ) of the soil columns, respectively (Fig. 3 and Table 4). This similar retardation of both enantiomers observed in the column leaching experiment with the three soils strongly supported the batch sorption data indicating insignificant enantioselectivity of the metolaxyl sorption process in soil (Table 2), because significant enantioselective sorption would have resulted in one enantiomer being leached earlier than the other, as schematically depicted in Fig. 4b and c. The leaching behavior for metolaxyl in our soils corresponded to that shown in Fig. 4a, where both enantiomers are equally sorbed but one enantiomer

is degraded to a greater extent than the other. Nevertheless, both enantiomers leached from the soil columns slightly earlier than predicted by the retardation factors (RF) theoretically calculated from the batch sorption distribution coefficients, assuming linear, instantaneous, and reversible sorption conditions (Eq. (4)), which were RF=4.8 (soil 1), 2.7 (soil 2), and 2.0 (soil 3) (Table 4). Non-attainment of sorption equilibrium during the column leaching experiment as well as non-linear sorption could have made the movement of metolaxyl enantiomers faster than predicted from batch sorption  $K_d$  values (Delphin and Chapot, 2006).

Despite both enantiomers being similarly retarded in the soil columns, in all leachates collected the concentration of S-metolaxyl was greater than that of R-metolaxyl (Fig. 3). This resulted in leachates with EF values > 0.5 and, as a consequence, the total cumulative amounts of S-enantiomer leached were greater than those of R-enantiomer (Fig. 3, Table 4). Given that enantioselective retention of metolaxyl in the soil column can be discarded as a cause for its enantioselective leaching behavior, the latter can be attributed mainly to the preferential degradation of the R-enantiomer inside the soil column (Fig. 4a), as supported by the results of the incubation experiment (Fig. 1). It is interesting to note that the enantioselectivity of metolaxyl leaching was particularly noticeable in soil 2, in which metolaxyl enantiomers displayed moderate sorption (Table 2) and high enantioselective degradation (Fig. 1). The low retention capacity and coarse texture of soil 3 resulted in the shortest residence time of metolaxyl in the soil column (Fig. 3, Table 4), which appeared to reduce the extent of degradation and the enantioselective leaching of the fungicide during the column experiment. The low enantioselectivity of metolaxyl degradation in soil 1 (Fig. 1) also resulted in little leaching enantioselectivity (Fig. 3), even though the high sorption capacity of this soil increased the residence time of the fungicide inside the soil column compared to soils 2 and 3. These effects were also reflected by the leachate EF values, which were particularly high for soil 2 (0.55–0.70). In this soil, the latter leachates collected contained 70% of S-metolaxyl and only 30% of the R-metolaxyl enantiomer.

### 4. Conclusions

The results presented in this work strongly indicate that sorption of metolaxyl in soil is non-enantioselective, although the question remains as to whether metolaxyl sorption is a "true" non-enantioselective process at the molecular scale or whether different enantioselectivities of soil components could have compensated to each other to result in the lack of enantioselectivity we measured at the macroscopic scale. Incubation experiments confirmed previous work indicating that, under aerobic conditions and slightly alkaline pH values, the dissipation of metolaxyl in soil is expected to be an enantioselective process with the R-enantiomer being degraded faster than the S-enantiomer, and go further indicating that the extent of such enantioselectivity is



**Fig. 4.** Hypothetical breakthrough curves (BTCs) for a racemic mixture of two enantiomers in soil columns where: (a) the two enantiomers are equally sorbed but enantiomer 2 is degraded to a greater extent than enantiomer 1 during leaching, (b) the two enantiomers are equally degraded but enantiomer 2 is sorbed to a greater extent than enantiomer 1, and (c) enantiomer 2 is sorbed and degraded to a greater extent than enantiomer 1. Sorption was assumed to be reversible in all cases.

soil-dependent even for soils with similar pH. It is proposed that sorption and entrapment in small-size pores could protect chiral pesticide enantiomers from biodegradation in soil and prolong their presence in racemic form. Our data also indicate that, once applied to the aerobic topsoil layer, enantioselective leaching of metalaxyl is likely to occur and to be influenced by the residence time of the fungicide in the topsoil layer, where degradation is usually faster than in the subsoil (Reichenberger et al., 2007), as well as by the effects exerted by other processes, such as sorption and nanopore entrapment. The fact that degradation of the biologically active *R*-metalaxyl enantiomer is faster than that of the non-active *S*-enantiomer indicates the potential to greatly reduce the environmental impact of metalaxyl in the soils studied by reducing the fraction of *S*-metalaxyl added to the soils.

#### Acknowledgment

This work has been financed by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO Project AGL2011-23779) and Junta de Andalucía (JA Project P07-AGR-03077 and Research Group AGR-264), cofinanced with European FEDER-FSE funds (Operative Program 2007–2013). B. Gámez and M.A. Adelino thank MINECO and JA, respectively, for their FPI fellowships. The authors also thank M.L. Cardo and M.J. Calderón for technical assistance and J. Cano for supplying one of the soils used in the experiments.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.105>.

#### References

Beserje K, Ugo AP, Spillner M. Environmental fate of trifloxystrobin in soils of different geographical origins and photolytic degradation in water. *J Agric Food Chem* 2006;54:9479–87.

Bertrando E, Hout S, Seta-Wittling C. Influence of compost addition to soil on the behavior of herbicides. *Pestic Sci* 1997;49:65–75.

Bermúdez-Guzmán A, Fernández-Galindo D, Pantoja-Muñoz M, García-Rodríguez R, Nieves-Muñoz JC, Arias-Estévez M. Adsorption and desorption behavior of metalaxyl in intensively cultivated acid soils. *J Agric Food Chem* 2011;59:7286–93.

Brake S, Brown CD. Evaluation of methods to derive pesticide degradation parameters for regulatory modelling. *Biol Fertil Soils* 2001;33:58–64.

Bremer WA, Kowalenko PR. Asymmetric adsorption of DL-alanine hydrochloride by quartz. *J Org Chem* 1976;41:2225–6.

Brown G. The X-ray identification and crystal structures of clay minerals. London: Mineralogical Society; 1961.

Buenger J, Prager T, Müller MD, Buser HR. Enantioselective degradation of metalaxyl in soils: chiral preference changes with soil pH. *Environ Sci Technol* 2003;37:2668–74.

Buenger J, Prager T, Müller MD, Buser HR. Influence of pH on the stereoselective degradation of the fungicides epoxiconazole and cyproconazole in soils. *Environ Sci Technol* 2006;40:443–50.

Buser HR, Müller MD, Prager T, Buser ME. Environmental behavior of the chiral acetamide pesticide metalaxyl: enantioselective degradation and chiral stability in soil. *Environ Sci Technol* 2002;36:221–6.

Geis R, Koskinen WC. An isotopic exchange method for the characterization of the irreversibility of pesticide sorption-desorption in soil. *J Agric Food Chem* 1999;47:782–90.

Geis R, Cox L, Hermosín MC, Cornejo J. Sorption of thiazuron by iron- and humic-acid coated montmorillonite. *J Environ Qual* 1997;26:472–9.

Geis R, Real M, Hermosín MC, Cornejo J. Sorption and leaching behavior of polar aromatic acids in agricultural soils by batch and column leaching tests. *Eur J Soil Sci* 2005;56:287–97.

Geis R, de Jongh W, de Jongh LW, Real M, Hermosín MC, Cornejo J. The role of mineral and organic components in phthalate and dibenzofuran sorption by soil. *Eur J Soil Sci* 2006;57:108–19.

Chen S, Liu W. Enantioselective degradation of metalaxyl in anaerobic activated sewage sludge. *Bull Environ Contam Toxicol* 2009;82:327–31.

Cheng H, Hu E, Hu Y. Impact of mineral micropores on transport and fate of organic contaminants: a review. *J Contam Hydrol* 2012;120:13030–00.

Guz-González M, Geli R, Hermosín MC, Leano P, Nogueira M, Cornejo J. Sorption-desorption of lead (Pb) and mercury (Hg) by model associations of soil colloids. *Soil Sci Soc Am J* 2003;67:1378–87.

Delphin JS, Chapot JF. Leaching of atrazine, metolachlor and diuron in the field in relation to their injection depth into a silt loam soil. *Chemosphere* 2006;64:1862–8.

Fernandes MC, Cox L, Hermosín MC, Cornejo J. Adsorption-desorption of metalaxyl affecting dissipation and leaching in soils: role of mineral and organic components. *Pest Manag Sci* 2008;64:45–52.

Flores-Gispodes F, González-Prados E, Fernández-Pérez M, Millanes-Sánchez M. Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil. *J Environ Qual* 2002;31:880–8.

FOCUS. Guidance document on estimating persistence and degradation kinetics from environmental fate studies on pesticides in EU registration. Report of the FOCUS work group on degradation kinetics. EC document reference: Saeco/10058/2005 version 2.0; 2006 [<http://focus.jrc.ec.europa.eu/pesticides/>].

Frondel G. Characters of quartz fibers. *Am Mineral* 1970;55:17–27.

Geli R, Geli R, Hermosín MC, Cornejo J. Soil clay modification with spermine and its effect on the behavior of the herbicide flumetsuron. *Soil Sci Soc Am J* 2012;76:432–40.

Garrison AW. Probing the enantioselectivity of chiral pesticides. *Environ Sci Technol* 2006;40:18–23.

Garrison AW, Schmitt P, Matern D, Kottrop A. Enantioselective selectivity in the environmental degradation of dichlorprop as determined by high-performance capillary electrophoresis. *Environ Sci Technol* 1996;30:2449–55.

Hamer T, Wilberg K, Norstrom R. Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signatures in environmental analysis. *Environ Sci Technol* 2003;34:218–20.

Hazen RM, Pilley TR, Goodfield GA. Selective adsorption of L- and D-amino acids on calcite: implication for biochemical homochirality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5487–90.

Jackson ML. Soil chemical analysis. 2nd edition. Madison: University of Wisconsin; 1973.

Koskinen WC, Harper SS. The retention process: mechanisms. In: Cheng HH, editor. Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling. Madison; 1990. p. 51–7.

Kurt-Krause PB, Billen TF, Jones KC. Chiral organochlorine pesticide signatures in global background soils. *Environ Sci Technol* 2005;39:671–7.

Lewis DL, Garrison AW, Wornatck KE, Whitham A, Smaller P, Melillo J. Influence of environmental changes on degradation of chiral pollutants in soils. *Nature* 1999;401:308–10.

Li J, Zhang G, Qi S, Liu J, Peng X. Concentrations, enantiomeric compositions, and sources of HCH, DDT and chlordane in soils from the Pearl River Delta, South China. *Sci Total Environ* 2006;372:215–24.

Liu Z, Lee C. The role of organic matter in the sorption capacity of marine sediments. *Mar Chem* 2007;105:240–57.

Magnan JO, Alonso-Prados JL, García-Saiz JM. Importance of considering pesticide stereoisomers: proposal of a scheme to apply Directive 91/414/CEE framework to pesticide active substances manufactured as isomeric mixtures. *Chemosphere* 2002;40:461–9.

Marín-Benito JM, Sánchez-Martín MJ, Andrades MS, Pérez-Clavijo M, Rodríguez-Guzmán MS. Effect of spent mushroom substrate amendment of vineyard soils on the behavior of fungicides. 1. Adsorption-desorption of penconazole and metalaxyl by soils and subsoils. *J Agric Food Chem* 2008;57:5634–42.

Matallo M, Romero E, Sánchez-Rosero F, Pella A, Díaz G. Adsorption of mecoprop and dichlorprop on calcareous and organic matter amended soils: comparative adsorption of racemic and pure enantiomeric forms. *J Environ Sci Health B* 1998;33:61–8.

Monkiedje A, Spillner M, Beserje K. Degradation of racemic and enantiopure metalaxyl in tropical and temperate soils. *Environ Sci Technol* 2003;37:707–12.

Monkiedje A, Zurbiler S, Jacqueline S, Manjini N, Spillner M. Elimination of racemic and enantiomerized metalaxyl based fungicides under tropical conditions in the field. *Chemosphere* 2007;69:65–63.

Nagel NK, Boerema L, DeBaker LW. Pore size distribution of soils from mercury intrusion porosimetry data. *Soil Sci Soc Am Proc* 1972;36:264–8.

Oliveira RS, Koskinen WC, Ferreira FA. Sorption and leaching potential of herbicides in Brazilian soils. *Weed Res* 2001;41:57–101.

Oravec M, Simek Z, Holoubek I. The effect of humic acid and ash on enantiomeric fraction change of chiral pollutants. *Chirality Sci Technol* 2010;20:80–5.

Pérez S, Rueda D. Application of HPLC-MS to quantification and evaluation of the environmental fate of chiral drugs and their metabolites. *Trends Anal Chem* 2008;27:836–46.

Pignatelli JJ, Xing B. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ Sci Technol* 1996;30:1–11.

Ramezani MK, Oliver DP, Koskane RS, Luo W, Gill G, Presto C. Faster degradation of herbicidally-active enantiomer of imidazolinones in soils. *Chemosphere* 2010;79:1040–5.

Rao PSC, Hornsby AG, Jessup RE. Indices for ranking the potential for pesticide contamination of groundwater. *Proc Soil Crop Soc Soc Fla* 1985;44:1–8.

Reichenberger S, Bach M, Schenck A, Friede HG. Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness: a review. *Sci Total Environ* 2007;384:1–15.

Romero E, Matallo M, Pella A, Sánchez-Rosero F, Schmitt-Koppin PB, Díaz G. Dissipation of racemic mecoprop and dichlorprop and their pure R-enantiomers in three calcareous soils with and without peat addition. *Environ Pollut* 2001;111:200–15.

Tan H, Cao Y, Tang T, Qian K, Chen WL, Li J. Biodegradation and chiral stability of flumil in aerobic and flooded paddy soils. *Sci Total Environ* 2008;407:428–37.

Tomlin CD. The pesticide manual. 14th edition. Hampshire: British Crop Protection Council; 2006.

Ulrich RM, Fontana WT, Van Metre PC, Wilson JT, Rounds SA. Enantiomer fractions of chlordane components in sediment from US Geological Survey sites in lakes and rivers. *Sci Total Environ* 2009;407:5804–03.

- Wedyan M, Preston MR. Enantio-selective adsorption of amino acids by components of natural sediments. *Environ Sci Technol* 2005;39:2115–9.
- Wen Y, Yuan Y, Chen H, Xu D, Lin K, Liu W. Effect of chitosan on the enantioselective bioavailability of the herbicide diisoprop to *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ Sci Technol* 2010;44:4081–7.
- Wong P, Kari-Karikou P, Bidleman TF. Fate of brominated flame retardants and organochlorine pesticides in urban soil: volatility and degradation. *Environ Sci Technol* 2012;46:2868–74.
- Ye J, Zhao M, Liu J, Liu W. Enantioselectivity in environmental risk assessment of modern chiral pesticides. *Environ Pollut* 2010;158:2371–83.
- Zipper C, Suter MJF, Haderlein SB, Groll M, Kohler HPE. Changes in the enantiomeric ratio of (R)- to (S)-metoprolol in situ biodegradation of this chiral herbicide in a polluted aquifer. *Environ Sci Technol* 1998;32:2070–6.

V Congresso Ibérico da Ciência do Solo  
V Congreso Ibérico de la Ciencia del Suelo  
(V CICS 2012)



Organização





# Formulaciones basadas en bionanomateriales arcillosos para reducir la lixiviación del herbicida clopiralida en el suelo

M.A. Adelino, R. Celis, M.C. Hermosín, J. Cornejo

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, P.O. Box 1052, 41080 Sevilla, España. E-mail: madelino@irnas.csic.es

## Resumen

El quitosano [poli- $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa] es un polisacárido catiónico de origen natural que se ha utilizado recientemente para la preparación de bionanomateriales arcillosos. Trabajos recientes han demostrado que la intercalación de quitosano en montmorillonita aumenta la capacidad adsorbente del mineral de la arcilla para diferentes contaminantes aniónicos y para herbicidas ácidos, como la clopiralida. En este trabajo, se ha evaluado la capacidad de los complejos montmorillonita-quitosano de actuar como soporte del herbicida clopiralida con el fin de liberarlo lentamente y reducir su lixiviación en el suelo. Para ello, el herbicida previamente adsorbido en un complejo montmorillonita-quitosano se añadió a columnas de suelo de 20 cm de longitud y 3 cm de diámetro interno y se comparó su perfil de lixiviación con el del herbicida libre disuelto en agua. Respecto a la aplicación del herbicida libre no soportado, la aplicación en superficie de clopiralida en forma de complejo montmorillonita-quitosano retrasó la lixiviación del herbicida tanto en un suelo ácido (pH= 4.5) como en uno alcalino (pH= 8.0), mientras que cuando el herbicida fue incorporado a 1 cm de profundidad, la lixiviación sólo se retrasó en el suelo ácido. Este comportamiento se atribuyó a la destrucción del complejo adsorbente-herbicida tras su incorporación a una cierta profundidad en el suelo alcalino. La forma de aplicación de la formulación y el pH del suelo resultaron ser factores determinantes del patrón de liberación y lixiviación del herbicida clopiralida soportado en el complejo montmorillonita-quitosano.

## Introducción

La preocupación por la pérdida de la calidad de los suelos agrícolas ha ido en aumento en los últimos años, debido, en parte, a la contaminación sufrida por productos fitosanitarios y otros compuestos de origen antropogénico. Es por ello que existe un aumento en el interés por prevenir en lo posible la contaminación de dichos suelos para preservar su calidad.

Los bionanocomposites o bionanomateriales se han convertido en materiales de gran interés debido a sus propiedades estructurales y funcionales. En particular, los bionanomateriales basados en arcillas están despertando un interés cada vez mayor por las posibles aplicaciones que presentan las propiedades asociadas a su escala nanométrica (Darder et al., 2003; An and Dultz, 2007; Aguzzi et al. 2010). El quitosano es un polisacárido catiónico de origen natural que se ha utilizado recientemente para la preparación de bionanomateriales arcillosos, con buenas propiedades adsorbentes para especies aniónicas debido a que los grupos  $-NH_3^+$  del biopolímero, que no participan directamente en la interacción con el mineral de la arcilla, pueden actuar como sitios de cambio aniónico adicionales o de enlace polar (Darder et al., 2003; Celis et al., 2012). En consecuencia, estos complejos arcilla-quitosano pueden ser útiles en diferentes aplicaciones relacionadas con la adsorción de aniones, tales como el desarrollo de sensores potenciométricos o la depuración de aguas contaminadas con elementos traza en sus formas aniónicas (Darder et al., 2005; Bleiman and Mishael, 2010).

Los pesticidas con características ácidas, que se presentan a menudo en sus formas aniónicas al pH de los compartimentos medioambientales, constituyen un problema de contaminación de suelos y aguas superficiales y subterráneas, porque normalmente son retenidos muy débilmente por los componentes sólidos de suelos y sedimentos (Celis et al., 1999). Por este motivo, el desarrollo de adsorbentes dirigidos a reducir la elevada movilidad que presentan estos pesticidas en el medio ambiente tiene un indudable interés desde el punto de vista de la prevención y remediación de la contaminación de suelos y aguas.

En un trabajo previo, se prepararon diferentes sistemas organoarcillosos (SW-CH) basados en quitosano (CH) y una montmorillonita de Wyoming (SW), para posteriormente evaluar las propiedades de los mismos como adsorbentes del herbicida ácido clopiralida (Celis et al., 2012). En medio acuoso, los sistemas SW-CH presentaron buenas propiedades adsorbentes para el herbicida clopiralida a niveles de pH donde predominaban la forma aniónica del herbicida ( $pK_a= 2.1$ ) y la forma catiónica del quitosano ( $pK_a= 6.3$ ), es decir, en un rango de pH de 3-5. El proceso de adsorción del herbicida fue rápido, lineal y

reversible, compatible con la adsorción del herbicida por un mecanismo de cambio aniónico sobre los sitios con carga positiva del biopolímero asociado al mineral de la arcilla.

En este trabajo se ha evaluado la capacidad de un complejo montmorillonita-quitosano (SW-CH) de actuar como soporte del herbicida clopiralida con el fin de liberarlo lentamente y reducir su lixiviación en el suelo. Para ello, tras adsorber el herbicida en el complejo SW-CH, se determinó la capacidad de la formulación obtenida de reducir la lixiviación del herbicida en columnas de suelo en comparación a la aplicación del herbicida libre sin soportar, usando dos suelos con diferentes valores de pH y dos formas distintas de aplicación del herbicida (en superficie y enterrado).

#### Materiales y métodos

##### Materiales

El mineral de la arcilla utilizado para la síntesis del bionanocomposite fue montmorillonita de Wyoming SWy-2, suministrada por The Clay Minerals Society (Universidad de Purdue, Indiana). La montmorillonita fue saturada en sodio mediante tres tratamientos sucesivos de 10 g de arcilla con 200 ml de una disolución de NaCl 1 M, tras lo que se lavó con agua desionizada, se liofilizó y se conservó a temperatura ambiente. A la montmorillonita resultante (SW) se asoció quitosano (Figura 1) de bajo peso molecular proporcionado por Sigma-Aldrich (España). El quitosano (CH) es un polímero catiónico natural que forma parte de los exoesqueletos de crustáceos e insectos, de la pared celular de los hongos y los microorganismos. El grupo amino en el CH tiene un valor pKa de 6.3, razón por la cual posee una ligera carga positiva y es soluble en medios ácidos, dependiendo su carga del pH y pudiendo ligarse negativamente a superficies cargadas negativamente, tales como las superficies externas y/o internas de las arcillas.

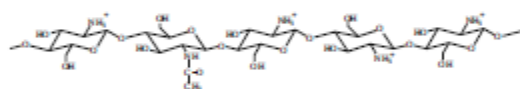


Figura 1. Estructura química del quitosano.

El herbicida clopiralida (Figura 2) utilizado en este estudio fue suministrado por Sigma-Aldrich (España) con una pureza del 99%. Se trata de un herbicida selectivo de la familia de los ácidos piridino-carboxílicos utilizado para el control de malas hierbas de hoja ancha en diferentes cultivos a dosis de 50-200 g/ha. Tiene un pKa de 2.1, un peso molecular de 192 g/mol y una solubilidad en agua de 1 g/l (20 °C). Su forma aniónica predomina a los valores de pH de la mayoría de los compartimentos ambientales.

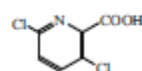


Figura 2. Estructura química de la clopiralida.

Para los experimentos de lixiviación se eligieron dos suelos con diferente composición y pH. El suelo 1 fue un suelo ácido (pH= 4.5) de origen forestal con un 56% de arena, 33% de limo, 11% de arcilla y 5.5% de carbono orgánico. El suelo 2 fue un suelo alcalino (pH= 8.0) de origen agrícola con un 63% de arena, 16% de limo, 21% de arcilla y 1.4% de carbono orgánico. Los suelos se recogieron del horizonte superficial (0-20 cm), se secaron al aire, se tamizaron con un tamiz de 2 mm y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

### Métodos

**Síntesis del complejo SW-CH.** Para la síntesis del complejo SW-CH, se añadieron 0.8 g de arcilla (SW) a 200 ml de una solución acuosa (pH= 5.0) que contenía 650 mg de CH y 3 mmol de ácido acético. La suspensión resultante se agitó durante 24 horas a 25 °C, se centrifugó, se lavó cinco veces con 200 ml de agua desionizada, se liofilizó y el complejo SW-CH resultante se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

**Caracterización del complejo SW-CH.** El complejo SW-CH se caracterizó por análisis elemental, difracción de rayos X y espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier. Los análisis elementales se llevaron a cabo utilizando un analizador elemental Perkin-Elmer, modelo 1106. Los diagramas de difracción de rayos X se obtuvieron utilizando un difractómetro Siemens D-5000 con radiación CuK $\alpha$ , en agregados orientados. Los espectros de infrarrojos se obtuvieron con un espectrómetro Jasco FT / IR 6300 (Jasco Europe Srl), colocando la muestra sólida directamente en el portamuestras horizontal de reflectancia total atenuada (ATR) de la celda.

**Experimentos de adsorción.** La isoterma de adsorción de clopiralida a SW-CH se obtuvo equilibrando por agitación 20 mg de SW-CH con 8 ml de disoluciones acuosas con diferentes concentraciones de clopiralida ( $C_{in}$ = 0.1-100 mg/l) preparadas en HCl 1 mM. Las suspensiones se agitaron en tubos de centrifuga durante 24 h, se centrifugaron y los sobrenadantes se filtraron y analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la concentración de herbicida en la disolución de equilibrio,  $C_e$  (mg/l). La cantidad de clopiralida adsorbida,  $C_s$  (mg/kg), se determinó a partir de la diferencia entre las concentraciones de las disoluciones iniciales y de equilibrio.

La adsorción de clopiralida en los suelos 1 y 2 sin enmendar y enmendados con SW-CH se determinó agitando 0.5 g de suelo, sin enmendar o enmendado con SW-CH a dosis del 5% y del 10%, con 8 ml de una disolución de clopiralida 1 mg/l preparada en agua (pH = 6.5). Las suspensiones resultantes se agitaron durante 24 h a  $20 \pm 2$  °C, tras lo cual fueron centrifugadas y los sobrenadantes filtrados y analizados por HPLC. La cantidad de clopiralida adsorbida ( $C_a$ ) por los suelos enmendados y sin enmendar se determinó a partir de la diferencia entre las concentraciones iniciales del herbicida ( $C_{in}$ ) y equilibrio ( $C_e$ ). Los porcentajes de clopiralida adsorbida ( $Ad\%$ ) se determinaron a partir de la fórmula:  $\%Ad = [(C_{in}-C_e)/C_{in}] \times 100$  y los coeficientes de distribución ( $K_d$ ) se calcularon como:  $K_d = C_a/C_e$ .

**Preparación de la formulación SW-CH-Clopiralida.** Para la preparación de la formulación del herbicida clopiralida soportada en el complejo SW-CH, se pusieron en contacto 200 mg de SW-CH con 80 ml de una disolución de clopiralida de 100 mg/l preparada en HCl 1 mM. Tras agitar durante 24 h, la suspensión se filtró y el sólido resultante se sacó al aire para posteriormente molerlo en un mortero de ágata y conservarlo a temperatura ambiente hasta su uso. El porcentaje de herbicida en la formulación se determinó a partir de la diferencia entre la concentración de herbicida en la disolución inicial y final y fue del 1.4%.

**Experimentos de lixiviación.** La lixiviación se estudió en columnas de vidrio de 30 cm de longitud  $\times$  3.1 cm de diámetro interno empaquetadas a mano. En primer lugar se colocó lana de vidrio y se añadieron 10 g de arena de mar en el fondo de las columnas. Después se añadió el suelo (128 g de suelo 1 ó 164 g de suelo 2) hasta alcanzar 20 cm y, para terminar, otros 10 g de arena de mar. Las columnas se saturaron con agua, determinándose el volumen de poros de las mismas a partir de la diferencia entre el volumen añadido y el lixiviado: 72 ml para el suelo 1 y 64 ml para el suelo 2. El herbicida clopiralida se aplicó a las columnas a una dosis de 0.5 kg/ha, bien en forma libre bien como formulación soportada en SW-CH, en este último caso tanto en superficie como enterrada bajo 1 cm adicional de suelo. Diariamente, las columnas se regaron con 15 ml de agua y los lixiviados procedentes de las columnas se recogieron y analizaron por HPLC para determinar la concentración de clopiralida en los mismos. Tras la experiencia de lixiviación, la cantidad de herbicida residual en las columnas de suelo se extrajeron con una mezcla de agua/acetón/tri-flúor/ácido acético 91.5/5.0/3.5, analizándose posteriormente los extractos por HPLC.

### Análisis del herbicida

La clopiralida se analizó por HPLC utilizando un cromatógrafo Waters 1525 acoplado a un detector UV-VIS de fila de diodos Waters 2996. Las condiciones de análisis utilizadas fueron: una columna Nova-Pack C18 de 150 mm de longitud  $\times$  3.9 mm de diámetro interno, una fase móvil de

agua/acetonitrilo/ácido acético (91.5/5.0/3.5), con una velocidad de flujo de 0.7 ml/min, volumen de inyección de 25 µl y detección UV a 280 nm.

#### Resultados y discusión

##### Características del sistema SW-CH

A partir de los resultados del análisis elemental de la muestra SW-CH (7.0% de C y 1.20% de N) se estimó la cantidad de quitosano en la misma, que resultó ser del 14.6%. Asumiendo una completa ionización de los grupos  $-NH_2$  del biopolímero, la cantidad de quitosano presente correspondió a una cantidad muy próxima al 100% la capacidad de intercambio catiónico (CIC) de la montmorillonita (76.4 cmol/kg). Estudios previos han puesto de manifiesto que el pH es un factor decisivo en la interacción de quitosano con montmorillonita, porque un aumento en el pH conduce a una disminución en el grado de protonación del biopolímero, aumentando la cantidad adsorbida en la arcilla (An and Dultz, 2007). En nuestro caso, el pH final de la suspensión arcilla-quitosano fue de 5.0, pH al cual cabe esperar una protonación casi completa de biopolímero, que posteriormente se adsorbió hasta la saturar la CIC de la montmorillonita.

Los difractogramas de rayos X de la muestra original de montmorillonita saturada en sodio (SW) mostraron los espaciados basales esperados de 12.5 Å, para la muestra secada a temperatura ambiente, y de aproximadamente 10 Å, tras el calentamiento a 200°C. El complejo SW-CH presentó a temperatura ambiente un espaciado menos definido de aproximadamente 15 Å y una resistencia al colapso tras el calentamiento a 200 °C, manteniendo un espaciado de 13.7 Å. Este valor corresponde a una distancia entre láminas de arcilla en torno a 4 Å, lo que es consistente con la presencia de quitosano en el espacio interlamilar de la montmorillonita principalmente como una monocapa, que evitó el colapso de las láminas de arcilla tras el calentamiento a 200 °C (Darder et al., 2003; Bleiman and Mishad, 2010).

En el espectro de FT-IR de quitosano puro, se identificaron las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos O-H y N-H del biopolímero, próximas a 3300  $cm^{-1}$ , las correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos C-H, cercanas a 2900  $cm^{-1}$ , y las de tensión del grupo C=O (amida I) y deformación del grupo N-H a 1650  $cm^{-1}$  y 1590  $cm^{-1}$ , respectivamente. En el espectro de SW-CH, se observó un desplazamiento de la banda de deformación del grupo N-H hasta 1530  $cm^{-1}$  respecto al valor de 1590  $cm^{-1}$  encontrado para el quitosano puro, probablemente debido a la fuerte interacción que se produce entre las superficies cargadas negativamente de la montmorillonita y los grupos amino protonados ( $-NH_3^+$ ) del quitosano (Darder et al., 2003; Monvisade y Siriphanon, 2009).

##### Estudios de adsorción

En la Figura 3 se representa la isoterma de adsorción de la clopiralida en la montmorillonita original sin quitosano (SW) y en el complejo SW-CH obtenida a pH= 3. Como puede observarse, el aumento de la adsorción es considerable para el complejo (SW-CH) con respecto a la montmorillonita sin quitosano (SW), para la cual la adsorción fue prácticamente nula. La nula adsorción del herbicida en la montmorillonita original se debe a que a pH= 3 el herbicida se encuentra en su forma aniónica y es repelido por las superficies con carga negativa del mineral de la arcilla. La presencia de CH en el complejo neutralizó la carga superficial negativa de la arcilla y proporcionó sitios cargados positivamente que favorecieron la adsorción de la clopiralida (Celis et al., 2012).

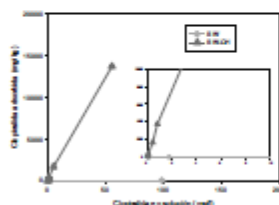


Figura 3. Isoterma de adsorción de la clopiralida sobre SW y SW-CH a pH= 3.



La Tabla 1 muestra los resultados de adsorción de clopiralida en los suelos 1 y 2 sin enmendar y enmendados con el complejo SW-CH en proporciones del 5% y del 10%. Puede observarse cómo la adición de SW-CH dio lugar a un aumento en la adsorción de clopiralida sólo en el caso del suelo ácido (suelo 1). Esto puede atribuirse a la presencia de sitios de intercambio catiónico en el complejo SW-CH sólo al pH de las suspensiones suelo/agua de este suelo ( $\text{pH} \sim 5.0$ , Tabla 1). Por el contrario, cuando SW-CH se añadió al suelo alcalino (suelo 2), el pH final de las suspensiones fue de 8.0 (Tabla 1), lo que probablemente provocó la pérdida de sitios con carga positiva del quitosano asociado a la arcilla ( $\text{pKa} = 6.3$ ) y con ello su capacidad adsorbente para la clopiralida.

Tabla 1. Parámetros de adsorción de clopiralida en suelos sin enmendar y enmendados con el complejo SW-CH.

Muestra	$\text{pH}_{\text{inicio}}$ 1	$\text{pH}_{\text{equilibr}}$ 2	%Ads	$K_d$ (l/kg)
Suelo 1	6.5	4.7	5	$0.67 \pm 0.08$
Suelo 1 + SW-CH (5%)	6.5	4.8	10	$1.72 \pm 0.27$
Suelo 1 + SW-CH (10%)	6.5	4.9	18	$3.56 \pm 0.09$
Suelo 2	6.5	8.0	< 5	< 0.5
Suelo 2 + SW-CH (5%)	6.5	8.0	< 5	< 0.5
Suelo 2 + SW-CH (10%)	6.5	8.0	< 5	< 0.5

#### Estudio de lixiviación

La Figura 4 muestra las curvas de lixiviación de la clopiralida en columnas con los suelos 1 y 2, tras la aplicación del herbicida bien en forma libre disuelto en agua bien adsorbido en SW-CH. La aplicación de la formulación (SW-CH-Clopiralida) a los dos suelos se realizó de dos formas distintas, directamente en superficie o enterrando la formulación a 1 cm de profundidad. Como podemos observar en la Figura 4, respecto a la aplicación del herbicida libre no soportado, la aplicación en superficie de clopiralida soportada en el complejo SW-CH retrasó la lixiviación del herbicida tanto en el suelo ácido (suelo 1) como en el alcalino (suelo 2), mientras que cuando el herbicida fue incorporado a 1 cm de profundidad, la lixiviación sólo se retrasó en el suelo ácido. Este comportamiento puede atribuirse a la destrucción del complejo adsorbente-herbicida tras su incorporación a una cierta profundidad en el suelo alcalino, lo que dio lugar a una rápida liberación del herbicida, resultado que está de acuerdo con los datos de adsorción de los suelos enmendados con SW-CH (Tabla 1). Estos resultados ponen de manifiesto que la forma de aplicación de la formulación y el pH del suelo son factores determinantes del patrón de liberación y lixiviación del herbicida clopiralida soportado en el complejo montmorillonita-quitosano.

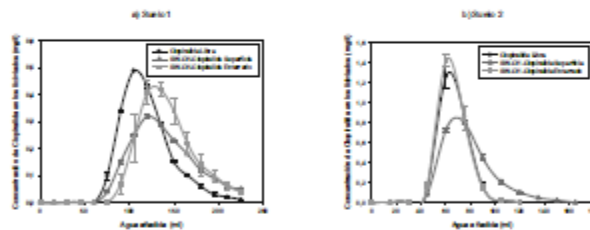


Figura 4. Curvas de lixiviación relativas de la clopiralida en columnas de suelo.

En la Figura 5 se representan las curvas de lixiviación acumuladas de clopiralida en las columnas de suelo, donde podemos observar las cantidades totales de herbicida recuperadas en los lixiviados. Las curvas acumuladas obtenidas para el herbicida libre muestran una recuperación del 75 % del herbicida añadido en el caso del suelo 1 (ácido) y próxima al 100% en el caso del suelo 2 (alcalino). Dado que no se detectó cantidad alguna de clopiralida en el interior de las columnas de suelo al finalizar el experimento de lixiviación, la cantidad no recuperada en el suelo 1 debe atribuirse a degradación del herbicida y/o a una adsorción irreversible al suelo durante el experimento. Las curvas acumuladas obtenidas tras la aplicación del complejo muestran que, si bien se produce un retraso en la lixiviación en el suelo 1 para los dos modos de aplicación y en el suelo 2 para la aplicación enterrada, las cantidades totales lixiviadas fueron próximas a las obtenidas para el herbicida libre.

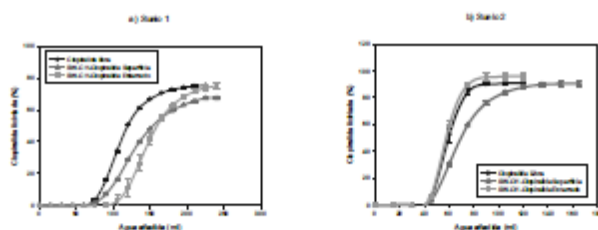


Figura 5. Curvas de lixiviación acumulada de la clopiralida en columnas de suelo

#### Conclusiones

La interacción del biopolímero quitosano con una montmorillonita resultó un complejo que mostró buenas propiedades adsorbentes para el herbicida clopiralida a pH=3, al que tanto la forma aniónica del herbicida como la forma catiónica del quitosano predominaron. La adición del complejo montmorillonita-quitosano a suelos fue efectiva a la hora de aumentar la adsorción de clopiralida, siempre que el pH del suelo presente niveles ligeramente ácidos y permita la existencia de cargas positivas en el polímero orgánico. La aplicación del herbicida preadsorbido en el complejo montmorillonita-quitosano o como bionanofórmula a columnas de suelo retrasó la lixiviación del herbicida cuando se aplicó a un suelo ácido tanto en superficie como enterrado y cuando se aplicó a un suelo alcalino en superficie. La forma de aplicación de la formulación y el pH del suelo resultaron ser factores determinantes del patrón de liberación y lixiviación del herbicida clopiralida soportado en el complejo montmorillonita-quitosano. Los resultados indican la viabilidad del complejo montmorillonita-quitosano de ser utilizado como soporte de plaguicidas aniónicos como la clopiralida, para reducir su elevada movilidad y, con ello, el riesgo de contaminación de suelos y aguas adyacentes.

#### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio Español de Ciencia e Innovación (MICINN, Proyectos AGL2008-04031-C02-01 y AGL2011-23779) y la Junta de Andalucía (JA, Proyecto P07-AGR-03077 y Grupo de Investigación AGR-264), con cofinanciación FEDER-FSE a través del Programa Operativo 2007-2013. M.A. Adelino agradece el MICINN la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador, también cofinanciada con FEDER-FSE.

#### Bibliografía

- Aguzzi C., Capra P., Bonferoni C., Salcedo I., Sánchez R., Caramella C., Viseras C. 2010. Chitosan-silicate biocomposites to be used in modified drug release of 5-aminosalicylic acid (5-ASA). *Applied Clay Science*, 50, 106-111.
- An J.-H., Dultz S. 2007. Polycation adsorption on montmorillonite: pH and T as decisive factors for the kinetics and mode of chitosan adsorption. *Clay Minerals*, 42, 329-339.
- Bleiman N., Mishael Y.G. 2010. Selenium removal from drinking water by adsorption to chitosan-clay composites and oxides: batch and column tests. *Journal of Hazardous Materials*, 183, 590-595.
- Celis R., Hermosin M.C., Cox L., Cornejo J. 1999. Sorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by model particles simulating naturally occurring soil colloids. *Environmental Science and Technology*, 33, 1200-1206.
- Celis R., Adelino M.A., Hermosin M.C., Cornejo J. 2012. Montmorillonite-chitosan bionanocomposites as adsorbents of the herbicide clopyralid in aqueous solution and soil/water suspensions. *Journal of Hazardous Materials*, 209-210, 67-76.
- Darder M., Colilla M., Ruiz-Hitzky E. 2003. Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. *Chemistry of Materials*, 15, 3774-3780.

---

### *Tema 2 – Propiedades e procesos de solo*

---

- Darder M., Colilla M., Ruiz-Hitzky E. 2005. Chitosan-clay nanocomposites: application as electrochemical sensors. *Applied Clay Science*, 28, 199-208.
- Monvisade P., Siriphannon P. 2009. Chitosan intercalated montmorillonite: preparation, characterization and cationic dye adsorption. *Applied Clay Science*, 42, 42